

MIKROKALORIMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

zum Betriebsstoffwechsel

UV - strahlensensibler Hefemutanten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Zentralinstitutes für Biochemie und Biophysik

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Bernd Schaarschmidt

aus Bad-Elster

1972

MIKROKALORIMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

zum Betriebsstoffwechsel

UV-strahlensensibler Hefemutanten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Zentralinstitutes für Biochemie und Biophysik

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Bernd Schearschmidt

aus Bad-Elster



1.Referent : Prof. Dr. W. Stein

2.Referent : Prof. Dr. E.-R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung : 15.6.1972

Tag der Promotion :

1. <u>Einführung</u>	1
1.1 <u>Bedeutung der Thermodynamik für biochemische Prozesse</u>	1
1.2 <u>Bedeutung der Strahlenbiologie für biochemische Prozesse</u>	2
1.3 <u>Übersicht über Reparaturprozesse bei Strahlenschäden</u>	3
1.3.1 Die DNS als hauptsächlichlicher Schadensbereich	3
1.3.2 Einzelne Reparaturprozesse	3
1.3.3 Strahlensensibilität und deren Beeinflussung	7
1.3.4 Untersuchungen an Hefen	8
1.4 <u>Problemstellung</u>	9
2. <u>Meßmethoden</u>	10
2.1 <u>Messungen mit einem Kalorimeter</u>	10
2.2 <u>Verwendung radioaktiv markierter Verbindungen</u>	11
2.3 <u>Photometrische Messungen von Wachstumskurven</u>	11
2.4 <u>Aufnahme von Dosiseffektkurven</u>	12
3. <u>Versuchsapparaturen</u>	12
3.1 <u>Das Mikrokalorimeter E.Calvet und Versorgungsgeräte</u>	12
3.2 <u>Kalorimeteereinsätze</u>	14
3.3 <u>Bestrahlungseinrichtungen</u>	18
4. <u>Biologisches Material</u>	20
4.1 <u>Saccharomyces Stämme</u>	20
4.2 <u>Kulturmedien</u>	21
4.3 <u>Vorbereitungen für die Experimente</u>	22
5. <u>Ergebnisse</u>	22
5.1 <u>Eichungen der Apparatur</u>	22
5.1.1 Empfindlichkeit des Kalorimeters	22
5.1.2 Eichung der Trübungsmessung mit Lichtleitern	24
5.1.3 Eichung des Bestrahlungslichtleiters	25
5.1.4 Kompensation der Strahlungsenergie im Kalorimeter	27

	Seite
5.2 <u>Wachstumsversuche</u>	28
5.2.1 Wachstum ohne Bestrahlung	28
5.2.2 Wachstum nach Bestrahlung	30
5.2.3 Kurzzeitige Bestrahlung während des Wachstums	32
5.3 <u>Dosiseffektkurven</u>	33
5.3.1 Inaktivierungsversuche	33
5.3.2 Reaktivierungsversuche mit Glucosezusatz	35
5.4 <u>Betriebsstoffwechsel des Wildtypes</u>	40
5.5 <u>Betriebsstoffwechsel der strahlensensiblen Mutanten</u>	43
5.6 <u>Betriebsstoffwechsel unter N₂- und O₂-Druck</u>	46
5.7 <u>Betriebsstoffwechsel bei Atmungsschädigung</u>	48
5.8 <u>Betriebsstoffwechsel nach UV-Bestrahlung</u>	52
5.9 <u>Besondere Effekte in den Thermogrammen</u>	55
5.9.1 Nebenmaximum	55
5.9.2 Einstoßpeak	57
5.9.3 Oszillationen unter O ₂ -Druck	59
5.9.4 Auftreten eines Minimums nach dem Anfangsmaximum	60
5.10 <u>Glucoseaufnahmeversuche mit ¹⁴C-Markierung</u>	61
6. <u>Diskussion der Ergebnisse</u>	64
6.1 <u>Kurzer Abriß über die Grundmechanismen bei Dunkel-reparatur, Replikation, Transskription und Rekombination</u>	64
6.2 <u>Wachstumsgeschwindigkeit und Strahlensensibilität</u>	70
6.3 <u>Die Energieabhängigkeit von Reparaturprozessen</u>	71
6.4 <u>Der Betriebsstoffwechsel als Charakteristikum der Energieverhältnisse in der Zelle</u>	74
6.5 <u>Betriebsstoffwechsel und Strahlensensibilität</u>	80
6.6 <u>Abschätzung des Energiebedarfs von Reparaturprozessen</u>	83
7. <u>Zusammenfassung</u>	87
<u>Literaturverzeichnis</u>	89

1. Einführung

1.1 Bedeutung der Thermodynamik für biochemische Prozesse

Die modernen Naturwissenschaften, die sich mit dem belebten Organismus befassen, sind immer mehr bestrebt, die Lebensvorgänge auf molekularer Ebene aufzuklären. Dazu sind die Gesetzmäßigkeiten der Chemie und Physik anzuwenden, nach denen auch alle biochemischen Mechanismen ablaufen. Oberstes Prinzip ist dabei der Energieerhaltungssatz, denn biologische Lebensäußerungen sind immer mit Energieumwandlungen verbunden. Diese wiederum werden durch die Gesetze der Thermodynamik beschrieben, welche auch für Vorgänge in belebter Materie gültig sind.

Die Anwendung der Klassischen Thermodynamik auf lebende Organismen fordert die Annahme eines geschlossenen Systems. Diese Bedingung ist in einem Organismus sicher nicht erfüllt. Das Problem kann dahingehend umgangen werden, daß man das System abschließt unter Hinzunahme der näheren Umgebung, also z.B. eine oder mehrere Zellen einschließlich Nährmedium und Thermostat. Die Aussagen der Klassischen Thermodynamik sind jedoch insofern nur beschränkt anwendbar, als sich der Organismus wegen der endlichen Zeit der in ihm ablaufenden Vorgänge fast immer sehr weit von einem Gleichgewicht entfernt befindet, die Theorie aber nur kleine Abweichungen zuläßt. Dieser Mangel wird durch eine Erweiterung der Theorie auf irreversible Prozesse unter Einführung von Fließgleichgewichten aufgehoben. Unter gewissen Voraussetzungen lassen sich somit auch Aussagen über zeitlich veränderliche Vorgänge gewinnen.

Zur Untersuchung an Organismen, insbesondere Mikroorganismen, sind in letzter Zeit kalorimetrische Methoden sehr in den Vordergrund gerückt, da inzwischen auch Kalorimeter zur Messung kleinster Wärme-flüsse (ca. 10^{-4} cal/h), sogenannte Mikrokalo-rimeter, zur Verfügung stehen. (Eine Übersicht über die biologische Kalorimetrie findet man bei Lamprecht 1969 und Boivin et 1971).

Wurde früher nur der Gesamtumsatz an Energie bestimmt, gemittelt über alle Prozesse in einem Organismus bzw. einer Population und über die gesamte Wachstumszeit, so tritt in letzter Zeit immer mehr eine Differenzierung insofern ein, als einzelne Stoffwechselprozesse bzw. deren Reak-

tionsschritte in "in vitro" und "in vivo" Versuchen kalorimetrisch verfolgt werden. Das ist "in vivo" möglich durch entsprechende Auswahl des Mediums, des Organismus (Mutanten) und der Zugabe von Stoffen, die bestimmte Reaktionsschritte stimulieren bzw. hemmen können. In der vorliegenden Arbeit sollen mit einer kalorimetrischen Methode Probleme aus der Strahlenbiologie untersucht werden.

1.2 Bedeutung der Strahlenbiologie für biochemische Prozesse

Die Strahlenbiologie beschäftigte sich bis vor einigen Jahren ausschließlich mit der phänomenologischen Beschreibung der Wirkung von Strahlen auf Organismen und deren mathematischen Erfassung mit Hilfe der Treffertheorie. Seit etwa 15 Jahren (Isolierung der ersten Strahlensensiblen Mutante durch R.F. Hill 1958) konzentrieren sich die Untersuchungen auf die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Strahlenwirkung. Arbeiten an strahlensensiblen Mutanten und die Entdeckung von Reparaturmechanismen befruchteten die Vorstellung über die molekularbiologischen Vorgänge so grundlegend, daß auch wichtige Erkenntnisse über die Vorgänge bei der Replikation der DNS, bei der Rekombination und Mutation gewonnen werden konnten. Wenn diese Ergebnisse auch vorwiegend aus Versuchen an einfach aufgebauten Organismen, wie Bakterien, geliefert wurden, so könnten sie doch zur Klärung der Wirkungsmechanismen in höheren Organismen herangezogen werden, da auch in ihnen gleiche Reparaturvorgänge ablaufen (Übersicht bei Kössler 1970).

Bei Säugetierzellen dienen diese Untersuchungen hauptsächlich der gezielten Nutzung strahlentherapeutischer Maßnahmen, insbesondere der Behandlung von Krebs-Zellen.

Auf die Strahlenempfindlichkeit eines Organismus bzw. auf die Reparaturprozesse wirken eine Reihe von Umweltfaktoren ein, und es steht fest, daß nicht nur Schäden repariert werden, die durch Strahlen induziert werden. Damit rückt das Problem der Strahlenbiologie in den Fragenkreis um die Konstanzhaltung des Erbmaterials und dessen Fortentwicklung im Rahmen der Evolution.

1.3 Übersicht über Reparaturprozesse bei Strahlenschäden

1.3.1 Die DNS als hauptsächlichlicher Schadensbereich

Auf Grund einer Reihe von Untersuchungen (Microbeam Bestrahlung, Aktionsspektrum der Strahlung, Absorptionsspektrum von Zellkomponenten, Ploidiegradabhängigkeit) kann es heute als gesichert angesehen werden, daß die DNS der Haupttreffbereich in der Zelle ist. Bei ionisierenden Strahlen treten jedoch sicher auch cytoplasmatische Schäden auf (Zusammenfassung bei Haynes 1964).

Bei UV-Bestrahlungen sind eine Reihe von chemischen Änderungen an der DNS und den sie umgebenden Proteinen in "in vitro" Versuchen festgestellt worden (Beukers e. a. 1960, Wacker 1963). Hauptsächlich werden Dimerisationsprodukte von benachbarten Pyrimidinbasen eines Stranges gefunden. Daneben treten noch, jeweils abhängig von der Bestrahlungsdosis, Vernetzungen zwischen DNS und Proteinen, intra- und intermolekulare Verbindungen der DNS, sowie Strangbrüche auf. Den weitaus größten biologischen Schaden verursachen Pyrimidin-Dimere, darunter wiederum Thymin-Dimere, denn sie können die DNS-Synthese inhibieren sowie die Transskription auf die m-RNS "in vitro" und "in vivo" blockieren. Es gibt jedoch auch Untersuchungen, nach denen eine mehrfache Replikation mit Pyrimidin-Dimeren möglich ist (Bridges e. a. 1968) und eine Transskription, wenn auch fehlerhaft, stattfindet (Resnick e. a. 1971). Auf einen letalen Schaden kommen mehrere Dimere pro DNS-Molekül bei Wildstämmen (Setlow e. a. 1964), bei sensiblen Mutanten kann schon ein Dimer zum Tod führen (Khan e. a. 1970).

1.3.2 Einzelne Reparaturprozesse

Bislang kennt man drei, offensichtlich voneinander unabhängig wirkende Reparaturprozesse, die an der Zell-DNS wirken können.

- Photoreaktivierung
- Excision-Repair
- Post-Replication-Repair oder Recombination-Repair

Die Prozesse unterscheiden sich äußerlich dadurch, daß die Photoreaktivierung eine Behandlung der geschädigten Zellen mit Licht erfordert, die anderen Prozesse aber auch im Dunkeln ablaufen können. Excision-Repair

kann nur vor einer neuerlichen Replikation der DNS wirken, Post-Replication-Repair hingegen gerade während und nach der Replikation. Der Photoreaktivierungsprozeß arbeitet solange wie noch Dimere vorhanden sind.

Die drei Mechanismen seien im folgenden kurz dargestellt, wobei im weiteren Verlauf dieser Arbeit jedoch nur die Dunkelreparaturprozesse berücksichtigt werden sollen.

Photoreaktivierung

Unter Photoreaktivierung versteht man eine lichtabhängige Regeneration von strahlengeschädigten biologischen Systemen. Der Schaden (in der Population wirksam als Inaktivierung) wird durch UV-Bestrahlung ($3000 \text{ \AA}$) verursacht. Seine Eliminierung (in der Population als Reaktivierung sichtbar) erfolgt durch gleichzeitige oder nachfolgende Bestrahlung mit Licht anderer als der zur Inaktivierung verwendeten Wellenlänge (Schuster 1969, hier auch eine Zusammenfassung der molekularen Grundlagen). Es hat sich gezeigt, daß die Dimerenbildung durch ein wellenlängenabhängiges Gleichgewicht bestimmt ist, welches bei $2600 \text{ \AA}$ maximal zur Seite der Dimeren verschoben ist.

Der Mechanismus der direkten Photoreaktivierung verläuft nun derart, daß sich ein Photoreaktivierungsenzym (Rupert e. a. 1958, 1966) mit dem gebildeten Pyrimidindimer, welches als Substrat wirkt, zu einem Enzym-Substrat Komplex verbindet, welcher z.B. bei Bestrahlung mit längerwelligem Licht ($> 3000 \text{ \AA}$) aktiviert wird und unter gleichzeitiger Monomerisierung in die Pyrimidine und damit in eine regenerierte DNS-Struktur und das Enzymmolekül dissoziiert. Die Photoreaktivierung ist mithin ein Einenzymprozeß, der den Schaden "in situ" aufhebt, ganz im Gegensatz zu den Dunkelreparaturprozessen.

Die indirekte Photoreaktivierung ist nicht enzymabhängig und kann auch in phr^- -Mutanten* von statten gehen (Jagger e. a. 1965). Wahrscheinlich liegt ihr kein eigener Mechanismus zugrunde, sondern durch das reaktivierende Licht wird eine Verzögerung der Replikation hervorgerufen, so

* phr^- -Mutante = Mutante ohne Fähigkeit zur enzymatischen Photoreaktivierung

daß anderen Mechanismen, wie Excision-Repair, mehr Zeit zur Ausführung gelassen wird (Jagger e. a. 1962, 1965, 1969).

Photoreaktivierung wurde bislang gefunden in Bakterien (Rupert e. a. 1958), in Hefen (Rupert e. a. 1960), Blaualgen (Werbin e. a. 1968) einigen Vertebraten (Cook 1967), aber nicht in Säugetierzellen.

Post-Replication-Repair

Dieser insbesondere von Howard-Flanders (1968) und Rupp e. a. (1968) untersuchte Reparaturprozeß verläuft nach dem Schema einer genetischen Rekombination mit dem Austausch neusynthetisierter Schwesternstränge. Nicht reparierte Dimere in der DNS hinterlassen bei der Replikation (soweit sie dann überhaupt noch stattfindet) in den Tochtersträngen Einzelstranglücken, wobei durch Rekombination der Stücke neue einheitliche Stränge ausgebildet werden.

Einige Untersuchungen (z.B. Howard-Flanders 1968, Witkin 1969) zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Rekombinationsfähigkeit und Strahlensensibilität.

Eine bemerkenswerte Art von Recombination-Repair zeigen manche polyploide Organismen. Diploide Hefezellen z.B. können sehr viel resistenter gegen Strahlen sein als haploide, weil durch den doppelten Chromosomensatz ein Austausch von heilem DNS-Material möglich ist (multiplicity reactivation, Patrick 1964).

Excision-Repair

Der Prozeß der Excision-Repair beruht auf einem Multi-Enzym-Mechanismus, der die schadhafte Stellen aus der DNS entfernt und an ihre Stelle durch eine "de novo" Synthese neue Nucleotide einsetzt.

Die molekularen Vorgänge im Detail wurden vor allem an *Escherichia coli* studiert, und man erklärt sie gewöhnlich nach dem sogenannten "cut and patch" bzw. "patch and cut" Modell (Boyce e. a. 1964, Setlow e. a. 1964, s. Abb. 37).

Nach dem ersten Modell schneidet eine Endonuklease an der schadhaften Stelle eine Lücke in die DNS. Zusammen mit einer Exonuklease wird der Einschnitt erweitert und ein Stück der schadhaften DNS abgetrennt. Dies führt zu einer Degradation der DNS. In den so hinterlassenen Lücken beginnt eine Polymerase mit der Neusynthetisierung von Nucleotiden unter Benutzung des komplementären Stranges als "Template" und baut in 5'- 3'-Richtung ein neues DNS-Stück auf. Die Anheftung dieses Stückes mit seinem 3'-OH Ende an das 5'-Phosphat-Ende der alten DNS vermittelt schließlich eine Ligase.

Das "patch and cut" Modell verlangt die gleichen Enzymschritte nur in etwas anderer Reihenfolge, da nach dem Einschnitt durch die Nuklease sofort eine neue DNS an dieser Stelle synthetisiert wird, die während ihrer Polymerisierung die alte schadhafte DNS abschält. Das andere Ende wird wiederum durch den Schnitt einer Endo- oder Exonuklease bestimmt. Die Verbindung der alten und der neuen DNS übernimmt dann wieder eine Ligase.

Ein Enzym mit der kettenverknüpfenden Eigenschaft einer Ligase wurde gefunden von Gefter e. a. (1967) und Weiss e. a. (1967), eine DNS Polymerase von Boyle e. a. (1970) und Westergaard (1970); zwei Enzyme, eine Endo- und eine Exonuklease, die zusammen quantitativ Thymindimere ausschneiden, sind von Grossmann e. a. (1970) aus *Micrococcus luteus* isoliert worden, eine Endonuklease von Nakayama e. a. (1971).

Excision-Repair scheint ein phylogenetisch weit verbreiteter Reparaturprozeß zu sein, denn er wird nicht nur in Bakterien, Hefen und Protozoen, sondern auch in Säugetierzellen gefunden (Übersicht in Haynes e.a. 1968, Cleaver 1970). Einige andere Reaktivierungsmechanismen, wie Liquid-Holding-Recovery, Agar-Holding-Recovery, Thermal-Recovery, Incubation-Medium-Recovery und Host-Cell-Reactivation sind Abwandlungen des Excision-Repair Vorgangs; je nach äußeren Bedingungen wird die Aktivität der beteiligten Enzyme erhöht bzw. ihre Einwirkzeit verlängert.

1.3.3 Strahlensensibilität und deren Beeinflussung

Als Kriterium für die Strahlenempfindlichkeit gilt weitgehend die Überlebensmöglichkeit einer Zelle. Überleben nennt man das Vermögen einer individuellen Zelle zur unbeschränkten Reproduktion. Daneben werden auch andere biologische Prozesse wie DNS-, RNS- oder Protein-Synthese oder Atmung und Gärung herangezogen. In der vorliegenden Arbeit wird vorwiegend die Koloniebildungsfähigkeit gemessen werden.

Eine unterschiedliche Strahlensensibilität verschiedener Organismen kann zurückgeführt werden auf unterschiedliche, tatsächliche Wirksamkeit der Strahlung an der DNS. DNS von Bakterien liegt fast nackt vor, während DNS höherer Organismen in einer dichten Wasser-Proteinhülle verpackt ist, welche einen Teil der Strahlung absorbiert. Auch können manche Zellen ein beträchtliches Maß von Pigmenten enthalten, welche die Strahlung abfangen, bevor sie in das Zellinnere gelangt. Weiterhin spielt der Thymingehalt der DNS eine Rolle, denn Bakterien mit hohem Thymingehalt sind UV-empfindlicher als andere, da mehr Thymin-Dimere gebildet werden können (Haynes 1964). Das Vorhandensein und die Aktivität von Reparaturenzymen hat jedoch den größten Einfluß. Zum Beispiel hat der extrem strahlungsresistente *Micrococcus radiodurans* ein so gut funktionierendes Reparatursystem, daß nahezu 100 % aller Thymidimere innerhalb kürzester Zeit repariert werden (Boyce e.a. 1964, Setlow e.a. 1964).

Empfindlichkeitsunterschiede von Mutanten des gleichen Organismus sind immer auf das Wirken bzw. Fehlen von Reparatur-Enzymen zurückzuführen. Als Maß der Strahlenempfindlichkeit wird diejenige Dosis angegeben, nach deren Einwirkung noch ein bestimmter Prozentsatz von Überlebenden vorhanden ist (z.B. Abtötung auf 37 % $\hat{=}$ $1/e \hat{=}$ LD_{37}); 1 % $\hat{=}$ LD_1). Überleben ist die Fähigkeit, eine sichtbare Kolonie zu bilden.

Bei jeder Angabe einer Strahlenempfindlichkeit ist es unbedingt notwendig, die genauen Versuchsbedingungen anzugeben, da diese erheblich auf die Überlebensrate einwirken können (siehe folgendes Kapitel).

Beeinflussung der Strahlensensibilität

Die Sensibilität hängt stark ab von den äußeren und inneren Bedingungen, denen die Zelle ausgesetzt ist. Zellen aus der stationären Wachstumsphase (teilungsinaktiv) sind resistenter als solche aus der logarithmischen Phase (teilungsaktiv) (Alper 1958). Zellen aus einer sich teilenden Population können wiederum nach der Phase des Teilungszyklus unterschieden werden. In der S-Phase finden die wesentlichen Syntheseleistungen (Zunahme der DNS und der Kernsubstanz) der Zelle statt. Wegen des aktiven Zustandes der DNS sind solche Zellen strahlenempfindlicher als ruhende Zellen (Čecháček e.a. 1970). Auch gibt es eine Abhängigkeit vom Lebensalter (Crossfill 1959, Smith-Sonneborn 1971).

Es gibt viele Organismen, deren Überlebensrate nach Bestrahlung von der Vor- und Nachbehandlung abhängt. Vorbehandlung mit Temperaturänderung (Stein e.a. 1950, Alper 1960, Sarachek 1969), Hungern (Doudney 1971, Sedlíková 1971), anderswelliger Bestrahlung (photoprotection, photodynamischer Effekt), pulsierender Bestrahlung (split dose z.B. von Harm e.a. 1970, Fox e.a. 1970), Nachbehandlung mit Liquid- oder Agar-Holding (Patrick e.a. 1964a) kann sowohl erhöhend als auch erniedrigend auf das Überleben nach Bestrahlung wirken, doch ist jedesmal im Einzelfall zu prüfen, ob die entsprechende Behandlung auf die Art der Schädigung, auf den Reparaturvorgang oder den physiologischen Zustand der Zelle wirkt.

Schließlich ist die große Anzahl von Möglichkeiten der Beeinflussung durch Zugabe von chemischen Substanzen zu erwähnen, welche im allgemeinen gezielt auf einen Enzymschritt in einem der vielen Stoffwechselwege einwirken können und damit direkt oder indirekt auch auf die Reparaturprozesse. Nährstoffeffekte sind hierbei besonders hervorzuheben (Alper 1958).

1.3.4 Untersuchungen an Hefen

Die weitaus meisten Untersuchungen über Strahlensensibilität und Reparaturprozesse sind an Bakterien und Bakteriophagen ausgeführt worden. Wegen ihrer vergleichsweise einfachen Zuchtbedingungen und ihres weniger komplexen biologischen Aufbaues sind sie für biochemische Experimente geeigneter als andere Organismen.

Unter den Eukaryonten sind neben Zellkulturen vornehmlich Hefen als Untersuchungsobjekt ausgewählt worden. Man kennt inzwischen eine Reihe von UV-sensiblen Hefemutanten (Übersicht bei Game e.a. 1971), deren Reparatur-Mechanismen man untersucht hat, und man weiß, daß mindestens 22 Gene die UV-Strahlenempfindlichkeit kontrollieren.

Direkte biochemische Hinweise auf Dunkelreparaturprozesse liegen nur vereinzelt vor (Cox e.a. 1968, Unrau 1969), doch lassen sich aus dem Vergleich mit anderen Eukaryonten und vor allem mit Bakterien zumindest ähnliche Prozesse ziemlich sicher annehmen.

1.4 Problemstellung

Untersuchungen zur Strahlensensibilität und zum Reparaturvermögen von Mikroorganismen sind fast ausschließlich mit genetischen, seltener mit biochemischen Verfahren durchgeführt worden. Das liegt einmal an den geringen, sich physikalisch-chemisch äußernden Veränderungen, zum anderen an der nur schwer kontrollierbaren Vielzahl der einwirkenden Parameter.

Begrenzt man die Zahl dieser Größen durch entsprechende genetische Auswahl und definierte äußere Bedingungen und schließt das System physikalisch ab, so lassen sich durch Variation äußerer Parameter Meßwerte gewinnen, die auf spezifisches, biologisches Verhalten zurückzuführen sind.

In der vorliegenden Arbeit sind hierzu ausgewählt worden:

- verschiedene strahlensensible, aber sonst weitgehend isogene Mutanten von Hefen,
- ein Mikrokalorimeter als leicht abzuschließendes, thermodynamisches Meßsystem,
- der Einfluß einer Energiequelle, des Entwicklungszustandes von Sauerstoff und von Inhibitoren der Atmung als variable Parameter.

Die verwendeten strahlensensiblen Stämme werden phänomenologisch in ihrem Wachstums- und Reparaturvermögen verglichen, sowie insbesondere auf ihren Energiehaushalt untersucht, dessen Einfluß auf die Sensibilität charakterisiert werden soll. Hierzu bietet sich das Studium des Betriebs-

stoffwechsels ruhender Zellen an unter Berücksichtigung der oben genannten Parameter. Mit diesen Kenntnissen werden dann bestehende Modelle zum molekularen Mechanismus der Reparatur von Strahlenschäden zu diskutieren sein. Auf Grund von kalorimetrischen Meßergebnissen an bestrahlten Zellen soll schließlich versucht werden, den Energiebedarf von Reparaturprozessen abzuschätzen.

2. Meßmethoden

2.1 Messungen mit dem Kalorimeter

Mit kalorimetrischen Methoden kann der Wärmeumsatz einer chemischen Reaktion gemessen werden. Von besonderem Vorteil sind Kalorimeter, die nicht nur die insgesamt umgesetzte Wärme abzulesen gestatten, sondern mit denen die zeitliche Wärmeabgabe, also der Wärmefluß, bestimmt werden kann. Durch zeitlich kontinuierliche Aufzeichnung des Signals erhält man ein Thermogramm, dessen Verlauf die augenblickliche Enthalpieänderung $d(\Delta H)/dt$ (bei isobarer Versuchsführung) des untersuchten Systems anzeigt und dessen integrierte Funktion (der Flächeninhalt als Produkt aus Wärmefluß und Zeit) die Reaktionsenthalpie ergibt. Aus der Form der Thermogramme, insbesondere bei Variation verschiedener Versuchsparameter, lassen sich dann Rückschlüsse auf die Kinetik und den Zustand der ablaufenden Reaktionen ziehen.

Wegen der großen Empfindlichkeit des Anzeigesystems von Kalorimetern lassen sich schon Leistungen von einigen μW nachweisen, d.h. Reaktionen mit sehr geringen Substanzmengen. Für schnell ablaufende Prozesse wirkt sich die ziemlich große Zeitkonstante von einigen Minuten nachteilig aus, so daß schnelle Änderungen des untersuchten Systems nicht aufgelöst werden. Eine besondere Schwierigkeit für die Auswertung der Thermogramme stellt das Driften der Nulllinie (Basislinie) bei großen Empfindlichkeitseinstellungen dar. Die Abweichung resultiert aus der Störung des thermodynamischen Gleichgewichtes des Kalorimeters durch äußere Einflüsse. Es ist daher günstig, die Reaktionen erst nach Einführen der Kammern in das Kalorimeter und Erreichen des Gleichgewichts zu starten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mehrzahl der Versuche zum Betriebsstoffwechsel von strahlensensiblen Hefemutanten kalorimetrisch durchgeführt und ausgewertet.

2.2 Verwendung von radioaktiven Isotopen

Bei radioaktiver Markierung läßt sich mittels Messung des strahlenden Isotops sehr einfach der Verbleib einer Substanz verfolgen. Die Methode ist sehr empfindlich, da schon einige hundert Atome nachgewiesen werden können, i.a. erfordert das Verfahren aber eine ziemlich hohe Konzentration an radioaktivem Material. Nachgewiesen wird immer nur das radioaktiv markierte Element, nicht das gesamte Molekül, welches zwischenzeitlich sehr wohl um- oder abgebaut worden sein kann. Diese Schwierigkeit kann fast immer durch Mehrfachmarkierung umgangen werden.

Da bei Versuchen mit markierten Substanzen immer nur einzelne Proben gemessen werden, erhält man nur eine punktweise und keine kontinuierliche Messung, wodurch unter Umständen Feinstrukturen nicht erfaßt werden. Zum anderen geben die Messungen nur integrierte Effekte wieder, aus denen bei zeitlich dichter Messung aber ohne weiteres kinetische Werte ermittelt werden können.

In den folgenden Experimenten wurden die Aufnahme von Glucose (alle C-Atome markiert) in Hefezellen sowie deren weiterer Verbleib während des Betriebsstoffwechsels radioaktiv gemessen.

Die spezifische Aktivität in den verwendeten Lösungen betrug ca. 0,2 Curie pro Mol Glucose, so daß die Meßproben immer in einem guten Nachweisbereich des Szintillationszählers lagen ($>10^3$ Impulse/min).

2.3 Photometrische Messung von Wachstumskurven

Durch photometrische Aufnahme der Trübung einer wachsenden Zellpopulation erhält man wegen der Proportionalität zwischen Extinktion und Zellmasse die augenblickliche Zellzahl. Mit einem im Institut selbst angefertigten, temperierbaren Wachstumsphotometer (Thermostat mit Rührer, Lichtquelle, Photozelle, Schreiber) läßt sich die optische Trübung zeitlich verfolgen.

Mit Glucose als limitierenden Faktor erhält man eine sigmoide Wachstums-

kurve, aus deren logarithmischen Teil man Wachstumsgeschwindigkeit und Generationszeit entnehmen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem Wachstumskurven synchron, kalorimetrisch und optisch, aufgenommen, d.h. Aufzeichnen der Wärmeabgabe während der Zeit des Wachsens und gleichzeitiges Registrieren der Trübung in der Kalorimeterkammer mit einer Lichtleiteranordnung (siehe 3.3).

2.4 Aufnahme von Dosiseffektkurven

Durch statistisches Auszählen von Zellkolonien nach Bestrahlung lassen sich sogenannte Dosiseffektkurven oder Inaktivierungskurven gewinnen, die die Veränderung der Zahl der lebenden bzw. abgetöteten Zellen mit der applizierten Dosis angeben. In einem logarithmischen Raster erhält man dann punktweise eine mit der Dosis abfallenden Überlebenskurve, aus deren Verlauf auf Strahlensensibilität und, bei vorangegangener Zusatzbehandlung, auf die Wirkung von Agentien geschlossen werden kann. Die Gewinnung eines Punktes erfordert einen hohen Zeitaufwand, da die einzelnen Werte mit hohen Fehlern behaftet sind und deshalb meistens aus mehreren Experimenten gemittelt werden müssen. Dosiseffektkurven enthalten daher oft nur wenige Meßpunkte, so daß eine Feingliederung völlig verloren geht.

Bei den folgenden Versuchen wurden so Inaktivierungskurven aufgezeichnet, um die Wirkung einer Energiequelle (Glucose) auf das Dunkelreparaturvermögen zu überprüfen.

3. Versuchsapparaturen

3.1 Das Mikrokalorimeter E. Calvet und Versorgungsgeräte

Die kalorimetrischen Messungen wurden mit dem Mikrokalorimeter nach E. Calvet (Typ MS70 der Firma Setaram/Lyon) mit zwei Kammern zu 100 ml Inhalt durchgeführt. Das Gerät ist ein Differential-Kalorimeter, da nur in einer der beiden Kammern die Reaktion abläuft, und der Wärmefluß als Differenz der Thermospannungen zwischen den Thermoelementen der Reaktionskammer und der Gegenkammer (Vergleichskammer) gemessen wird. Der

Vorteil eines Differentialsystems liegt vor allem darin, daß alle äußeren sowie durch Manipulation an den Kammern auftretenden Störungen auch auf die Gegenkammer einwirken, womit der Gesamtstöreffekt weitgehend kompensiert wird. Aufbau und Prinzip des Kalorimeters sind z.B. bei Calvet e.a. (1956) und Calvet (1962) beschrieben worden, Wirkungsweise und Aufstellung in einem temperierten Meßraum bei Lamprecht (1969). Hier seien nur einige technische Daten des verwendeten Typs wiedergegeben.

Tabelle 1

TECHNISCHE DATEN DES MIKROKALORIMETERS MS 70

Kammern	Inhalt	100 cm ³		
	Durchmesser	35 mm		
	Höhe	120 mm		
Thermoelemente (Chromel-Konstantan)*				
große Säule	GS	1316	Verhältnis	4
mittlere Säule	MS	987		3
kleine Säule	PS	329		1
Empfindlichkeit				
große Säule	GS	60	/uV/mW	
mittlere Säule	MS	45	/uV/mW	
kleine Säule	PS	15	/uV/mW	

Die Heizung des Kalorimeters wird durch das Temperaturregergerät RT 3000 R (Fa. Setaram/Lyon) geregelt, wobei die gewünschte Arbeitstemperatur auf 1/10°C eingestellt werden kann, und die Regelung getrennt über einen Proportional-, Differential- und Integralanteil eingestellt wird.

Die Anzeige der vom Kalorimeter gelieferten EMK erfolgt über einen Kompensationsschreiber (Mikrograph BD 5 der Fa. Kipp & Zonen, Delft) mit

* GS = Grande Sensibilité, MS = Moyenne S., PS = Petite S.

automatischer Nullpunktunterdrückung. Empfindlichkeit und Vorschub lassen sich stufenweise einstellen, bei der empfindlichsten Einstellung lassen sich Energieflüsse von $3 \mu\text{W}$ nachweisen.

Die Auswertung und Integration der vom Schreiber gelieferten Thermogramme wird mit einem Polarplanimeter ausgeführt.

3.2 Kalorimereinsätze

Normalkammer

Befinden sich alle an der Reaktion beteiligten Komponenten schon gemischt in dem Reaktionsgefäß, bevor die Kammer in den Kalorimeterblock eingeführt ist, so werden zylinderförmige Kammern aus V2A-Stahl mit 1 mm Wandstärke verwendet, die nach oben durch einen Deckel verschraubt sind, an dem das Gestänge befestigt ist (Abb. 1a).

Mehrkomponentenkammer

Soll erst nach Einführung der Kammer eine Reaktion durch Zugabe bestimmter Substanzen gestartet werden, so können bis zu drei kleine Plexiglas-töpfchen mit einem Inhalt von je 0,9 ml an der Unterseite des Deckels befestigt werden. Sie werden zu dem gewünschten Zeitpunkt mittels eines durch das Gestänge geführten Drahtes in die Kammer hineingestoßen. Die Töpfchen bleiben dann auf dem Boden liegen oder werden mit einem an ihnen befestigten Nylonfaden wieder an den Deckel herangezogen (Abb. 1e).

Druckkammern

Für Messungen unter Gasdruck wird ein besonderer Verschuß mit einer Dichtung fest auf die Kammer geschraubt. Auf dem Deckel ist ein Gaseinfüllventil angeschweißt, an dem außerdem nach dem Füllen das Gestänge durch eine Steckverbindung angekuppelt werden kann (Swagelok tube fitting der Fa. Crawford/Canada). Die Kammern halten einem Druck bis zu 10 kp/cm^2 stand. Der Druck kann zu Beginn und nach Beendigung des Experimentes an einem aufsteckbaren Manometer abgelesen werden (Abb. 1b).

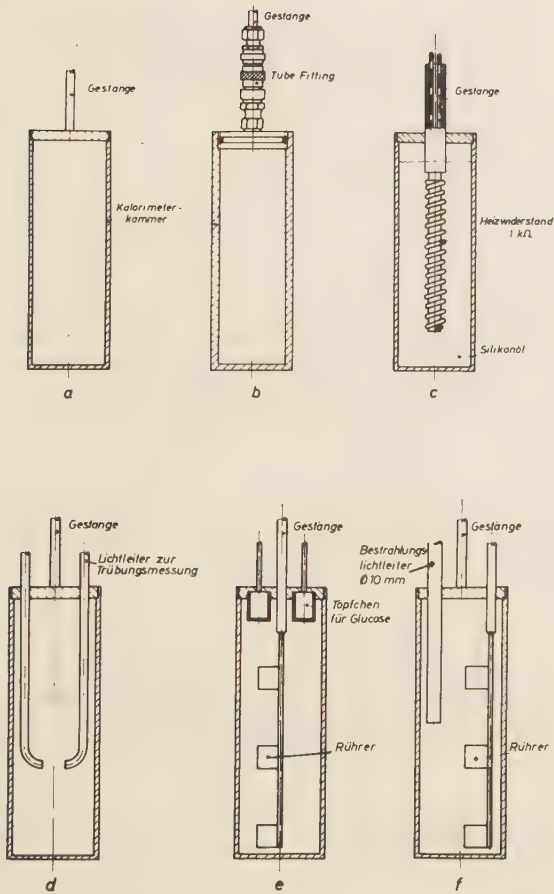


Abb. 1

Verschiedene Einsätze für die Kalorimeterkammer.

- a - Normalkammer, b - Druckkammer,
- c - Eichkammer, d - Einsatz zur Trübungsmessung,
- e - Rühreinrichtung in einer Mehrkomponentenkammer,
- f - Bestrahlungseinrichtung mit Rührer

Rühreinrichtung

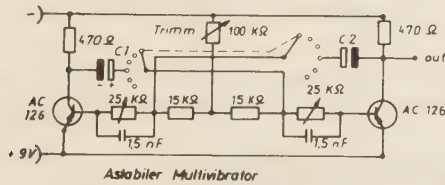
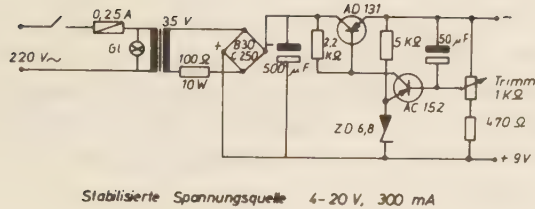
Wird der Kammerinhalt mit der Hefesuspension beimpft, so setzen sich die Zellen nach kurzer Zeit auf dem Boden ab, und es findet sicher kein vollständiger aerober Stoffwechsel statt, da der O_2 -Austausch nur durch die Oberfläche des Mediums erfolgen kann. Ein ständiges Rühren führt zu einer Anreicherung mit Luft und besseren Durchmischung der Suspension. Zu diesem Zweck wurde eine Rühreinrichtung angebracht, indem durch das Gestänge hindurch eine dünne Welle das Drehmoment eines über dem Kalorimeter angebrachten Drehmagneten auf die Rührschaufel überträgt (Abb. 1e + f) (Vergleiche auch Lamprecht 1969a). Die Form und die Anbringung der Rührflügel wurde so gewählt, daß die durch das Rühren entstehenden Turbulenzen nicht die optischen Messungen stören (siehe unten). Der Drehmagnet selbst wird erregt und gesteuert von einer astabilen Multivibratorschaltung, der eine stabilisierte Spannungsquelle und ein Leistungsverstärker vor- bzw. nachgeschaltet ist (Abb. 2).

Durch die Wahl der RC-Glieder können verschiedene Taktfrequenzen zwischen 0,3 und 60 s eingestellt werden, während die Impulsdauer (Ansprechzeit des Magneten) immer unter 1 s lag, so daß keine größeren Erwärmungen auftraten.

Das Rühren im Kalorimeter bringt trotz Lagerung der Welle an den Endpunkten Reibung und verbreitert das Signal. Gelegentlich kann sich auch die Nulllinie parallel verschieben, obwohl in der Gegenkammer auch gerührt wird. Für die Auswertung bedeutet dies jedoch keine Schwierigkeiten.

Trübungsmessung mit Lichtleitern

Zur Aufnahme der Wachstumskurven im Kalorimeter werden zwei Lichtleiter ($\varnothing$ 1 mm) so durch den Deckel der Meßkammer geführt (Abb. 1d), daß ihre starren, gegeneinander gebogenen Enden in den Kammerinhalt eintauchen und sich in Abstand von ca. 5 mm gegenüberstehen. Die oberen Teile der Lichtleiter sind flexibel und werden aus dem Kalorimeter herausgeführt. Einer der beiden Lichtleiter wird von einer Glühlampe (4V, 5W) beleuchtet und leitet das Licht über seine Länge von 740 mm (Energieverlust 20 %) in die Kammer, wo ein Teil von der Suspension absorbiert wird. Das transmittierte Licht tritt in den gegenüberstehenden Lichtleiter wieder



C_1	10	25	25	30	4	2500	μF
C_2	10	25	1000	5000	100	2500	μF

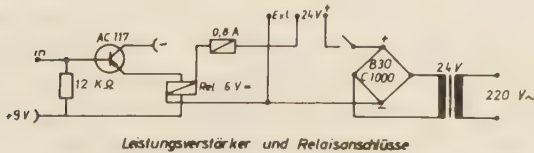


Abb. 2 Elektronische Schaltung des Impulsgebers für den Rührer in der Kalorimeterkammer

ein und wird am oberen Ende auf einen Photomultiplier (Typ 931A, Fa. RCA/USA) gegeben. Das Signal wird über einen Meßverstärker (Typ 3A, Fa. Knick/Berlin) auf einen Kompensationsschreiber (Typ Servogor RE 511, Fa. Metrawatt/Nürnberg) übertragen. Durch elektrostatische Abschirmung können Störungen, vor allem die Schaltimpulse des Multivibrators, so weit gedämpft werden, daß eine gut auswertbare Kurve entsteht (Abb. 10).

Eichkammern

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit und zum Eichen des Gerätes mittels des Joule-Effektes werden Eichkammern kommerziell geliefert, in denen ein 1000Ω Präzisionswiderstand befestigt ist (Abb. 1c). Die elektrischen Anschlüsse befinden sich am oberen Ende des Gestänges und werden mit einer möglichst konstanten Spannungsquelle verbunden. Durch Anlegen definierter Spannungen und Ströme lassen sich über das Gesetz der Jouleschen Stromwärme

$$W = I^2 \cdot R \cdot t$$

die angelegte Leistung mit der Wärmeabgabe im Kalorimeter vergleichen. Zur besseren Wärmeleitung werden die Eichkammern mit Silikonöl gefüllt.

Kombination von Rühreinrichtung, Bestrahlungseinrichtung (siehe folgendes Kapitel), Lichtleitern und Töpfchenzusatz ist möglich.

3.3 Bestrahlungseinrichtungen

Inaktivierungsversuche

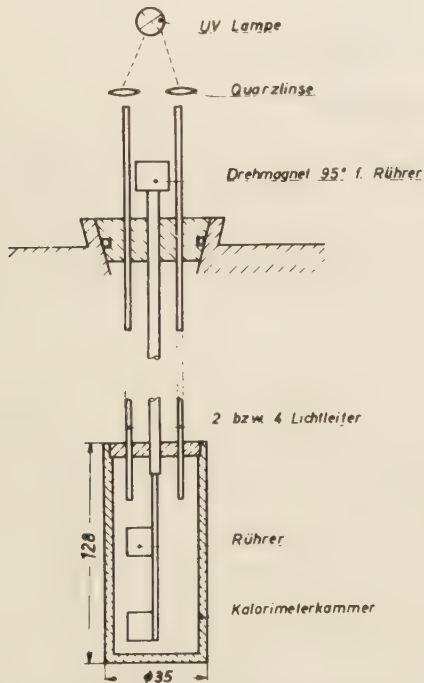
Die Inaktivierung unter UV-Bestrahlung wurde mit einer Quecksilberniederdrucklampe (Typ HNS 12 der Fa. Osram, Berlin) ausgeführt. Rund 78 % der Strahlungsenergie entfällt auf Quanten der Wellenlänge 253,7 nm, die Bestrahlungsstärke bei dieser Wellenlänge wurde mit einem Quantenflußmesser (Schaarschmidt 1970) zu $4,8 \text{ erg/mm}^2 \cdot \text{s}$ bestimmt.

Die Zellsuspension befand sich bei der Bestrahlung in kleinen Glasschälchen und wurde mechanisch gerührt. Die Zelltitel betrugen $3 \cdot 10^2$ bis $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml, so daß noch keine Strahlungs-Abschattung der Zellen auftreten konnte.

Bestrahlung im Kalorimeter

UV-Bestrahlungen im Kalorimeter erfolgten mit einer ähnlichen Lampe (Typ HNS 10/U ofr, Fa. Osram/Berlin) über Lichtleitstäbe aus Quarz (Typ QLG, Fa. Schott/Mainz); entweder wurden 1 bis 4 schmale Lichtleiter mit wirkamen Durchmesser von 3 mm oder 1 dicker Lichtleiter von 10 mm Durchmesser benutzt. Mit der in Abb. 3 angegebenen Anordnung ergaben sich mit

vorgesetzter Quarzlinse für die dünnen Lichtleiter Bestrahlungsstärken von $20 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{s}$ pro einzeltem Stab, bei dem starken Lichtleiter $230 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{s}$. Da der Strahlungskegel im allgemeinen nicht die gesamte Oberfläche erfaßte und meistens ein größeres Volumen als bei den Inaktivierungskurven mit den Bestrahlungsschälchen verwendet wurde, erhöhten sich die Bestrahlungszeiten erheblich, wenn man vergleichbare Abtötungsraten erzielen wollte (Kap. 5.1.3).



Bestrahlungsvorrichtung für ein Mikrokolorimeter

Abb. 3 UV-Bestrahlungseinrichtung für die Kalorimeterkammer

Die in die Kalorimeterkammer eingestrahlte Energie wurde bei den kleinen Lichtstäben durch gleichzeitige Bestrahlung in der Gegenkammer kompensiert. Bei den großen Lichtleitern war das nicht möglich, da kein zweiter Lichtleitstab für die Gegenkammer zur Verfügung stand. Die Kompensation erfolgte hier durch Wärmeerzeugung eines Widerstandes in der Gegenkammer (Eichung dazu siehe Kap. 5.1.3).

Bestrahlungen im Kalorimeter wurden stets unter Rühren der Suspension ausgeführt.

4. Biologisches Material

4.1 Saccharomyces-Stämme

Sämtliche Versuche wurden mit den von Laskowski e.a. (1968) und Averbek e.a. (1970) aus einer von Laskowski (1960) angelegten Sammlung weitgehend isogener und homozygoter Saccharomyces-Stämme isolierten strahlungssensiblen Mutanten durchgeführt. Hauptsächlich untersucht wurden die in ihrer Strahlenempfindlichkeit recht unterschiedlichen (siehe Kapitel 5.3) Diplonten, daneben zum Vergleich aber auch die entsprechenden Haplonten und Petites.

Tabelle 2

AUFSTELLUNG DER VERWENDETEN STRAHLENSENSIBLEN STÄMME

Diplonten	Genotyp*	Haplonten	Genotyp*
211	++	211-1aM	+
2012	++	—	—
298	$r_1^s r_1^s$	2110-222	r_1^s
S 2095	$r_2^s r_2^s$	2121-127	r_2^s
S 2094	$r_{3-2}^s r_{3-2}^s$	2105-15	r_{3-2}^s
<u>Petitesstämme</u>			
211p5	++	235-11c/p2	+
298p	$r_1^s r_1^s$	—	—
2095p	$r_2^s r_2^s$	—	—
2094p	$r_{3-2}^s r_{3-2}^s$	—	—

* Genotyp bezüglich der Strahlenempfindlichkeit, r^s = radiation sensitive, + = Wildtyp

Im Folgenden werden die Stämme gekürzt bezeichnet, also z.B. Stamm 2110 und Stamm 235. Die Bedürfnisse der Stämme brauchten nicht berücksichtigt zu werden, da das Wachstum stets auf Vollmedium überprüft wurde.

Die Stämme wurden in kleinen Schrägagarröhrchen mit Vollmediumkonzentration bei 4 °C aufbewahrt und alle 6 Monate auf ein neues Röhrchen überimpft.

4.2 Kulturmedien

Vollmedium

Zum Anzüchten der Stämme und für die Wachstumsversuche wurde flüssiges Vollmedium der Zusammensetzung 1 % Difco-Yeast-Extrakt, 0,5 % Pepton, 2 % Glucose und entmineralisiertes Wasser verwendet. Für die Ermittlung der Koloniebildung wurden Petrischalen mit festem Vollmedium benutzt, welches durch Zusatz von 2 % Agar hergestellt wurde.

Natriumlactatmedium

Zur Erkennung von atmungsdefekten Kolonien "Petites", wurde ein Nährmedium verwendet, welches an Stelle von Glucose Natriumlactat enthielt. Petites können Natriumlactat nicht veratmen und wachsen deshalb nicht auf diesem Medium.

Puffer, Glucosepuffer

Zum Waschen und Aufbewahren der Zellen bei der Dunkelreparatur sowie zur Bestimmung des Betriebsstoffwechsels wurde ein Puffer (pH 4,8) aus 0,05 m KH_2PO_4 benutzt. Je nach Versuchszielsetzung wurde dem Puffer verschiedene Mengen Glucose zugesetzt. Die markierte Glucose (D-Glucose- $^{14}\text{C(U)}$, Fa. NEN/Dreieichenhain) hatte eine spezifische Aktivität von 5,8 mC/mMol .

Alle Medien wurden 15 Minuten lang bei 123 °C in einem Autoklaven sterilisiert.

4.3 Vorbereitung für die Experimente

Der gewünschte Stamm wurde von dem Schrägagarröhrchen in ein Reagenzglas mit ca. 5 ml Vollmedium überimpft und bei 30 °C unter Schütteln mindestens 30 Stunden lang herangezüchtet. Bei den Versuchen zur Abhängigkeit von der Wachstumsphase (Kapitel 5.4) wurden die Zellen entsprechend früher aus der lag-Phase oder logarithmischen Phase entnommen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit Puffer gewaschen und einmal in Puffer fraktioniert zentrifugiert (2 Minuten bei 1000 Umdrehungen/min), so daß man im wesentlichen gleich große Einzelzellen zur Verfügung hatte. Anschließend wurde der Titer mit einer Zählkammer (Bürker-Türk-Hämatocytometer) mikroskopisch bestimmt. Durch entsprechendes Verdünnen wurde die Zelldichte auf den gewünschten Wert eingestellt und die Zellen in das, dem Versuch entsprechende Medium inkubiert.

Für die kalorimetrischen Messungen und die Aufnahmeversuche mit ^{14}C -markierter Glucose betrug der Titer 10^7 bis 10^9 Zellen/ml.

Die Wachstumsversuche wurden mit einem Anfangstiter von ca. $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml angesetzt.

Für die radioaktiven Messungen wurden die Proben abzentrifugiert, zweimal mit eiskaltem Glucosepuffer bei 0 °C gewaschen und zentrifugiert und anschließend in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Dioxan und Omnifluor) aufgenommen.

5. Ergebnisse

5.1 Eichungen der Apparatur

5.1.1 Empfindlichkeit des Kalorimeters

Die in Tabelle 1 aufgeführten Empfindlichkeiten sind vom Hersteller angegebene Mittelwerte. Für jedes Gerät müssen die individuellen Werte einzeln festgestellt werden, da das nachgeschaltete Anzeigesystem die Empfindlichkeit beeinflußt. Eine einfache Methode zum Eichern ist über den Joule-Effekt möglich. Dabei wird die Wärme gemessen, die ein stromdurchflossener Heizwiderstand abgibt. Hierzu wurde eine Eichkammer mit einem 1000 Ω -Widerstand (s. 3.2) verwendet, ein Spannungsnormalelement, ein Spannungsteiler und

zwei Präzisions-Zeigerinstrumente zur Anzeige von Strom und Spannung. Trägt man die am Kalorimeter (Schreiber) gemessenen Signale gegen die Stromleistung auf, so erhält man die Eichgerade für die Kalorimeteranzeige (Abb. 4).

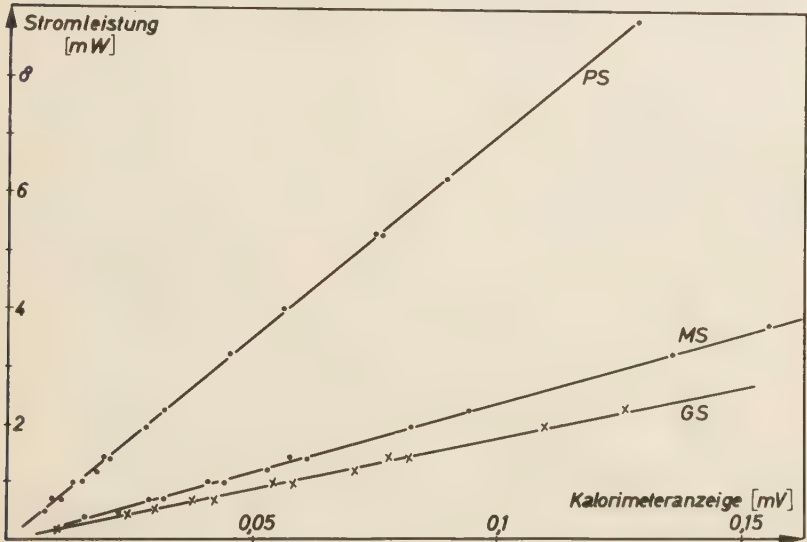


Abb. 4 Eichgerade für die Kalorimeteranzeige (GS, MS, PS, vgl. Fußnote auf S. 13)

Aus der Abbildung entnimmt man dann die Empfindlichkeiten des Kalorimeters für die entsprechende Einstellung der Thermoelemente.

Tabelle 3

ANZEIGEEMPFINDLICHKEIT DES MIKROKALORIMETERS

Zahl der Thermoelemente			Empfindlichkeit	Verhältnis
Kleine	Säule	PS	14,3 $\mu\text{V/mW}$	1
Mittlere	Säule	MS	42,4 $\mu\text{V/mW}$	2,97
Große	Säule	GS	56,3 $\mu\text{V/mW}$	3,94

Die Empfindlichkeiten sind etwa 10 % niedriger als die vom Hersteller angegebenen (s. Tab. 1), das Verhältnis der Empfindlichkeiten der Säulen liegt etwa 2 % unter dem vom Hersteller angegebenen. Bei höheren Meßbereichen des Schreibers wirken sich die niedrigeren Eingangsimpedanzen des Schreibers aus, das sich in einem Abknicken der Empfindlichkeitskurve bemerkbar macht (Abb. 5). Es erwies sich als zweckmäßig, eine Tabelle der Empfindlichkeiten für alle Meßbereiche aufzustellen.

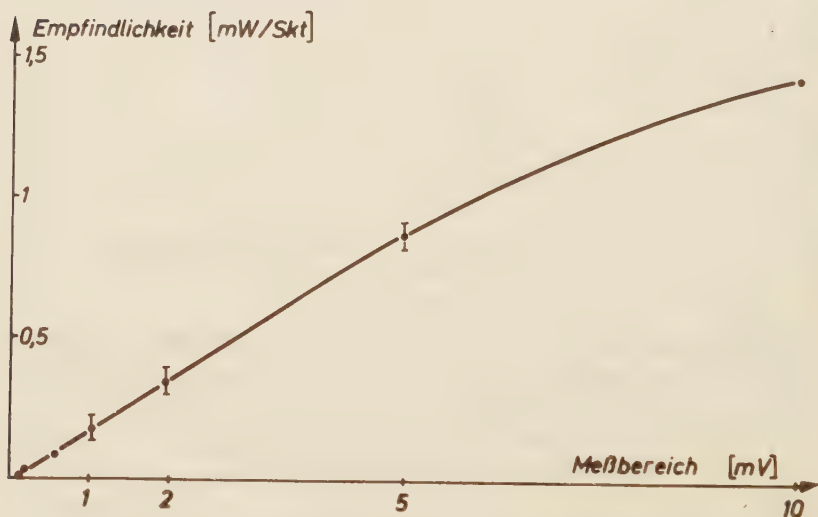


Abb. 5 Abhängigkeit der Kalorimeteranzeige vom eingestellten Meßbereich des Schreibers

5.1.2 Eichung der Lichtleiter zur Trübungsmessung

Die in Kapitel 3.1 beschriebene Anordnung zur Aufnahme der Wachstumskurven wurde durch Auszählen des Zelltiters mit einer Zählkammer (Kapitel 4.3) geeicht (Abb. 6). Da diese Methode mit ziemlich hohen Fehlern ($\pm 10\%$) behaftet ist, überträgt sich dieser Fehler auch auf die Auswertung der Versuche mit den Lichtleitern. Die Wärmeabgabe des Streulichtes in der Kalorimeterkammer betrug bei Nichtkompensation in der

Gegenkammer 10 μ W und konnte gegenüber den Wärmeflüssen von 10 mW bei Wachstumsversuchen vernachlässigt werden.

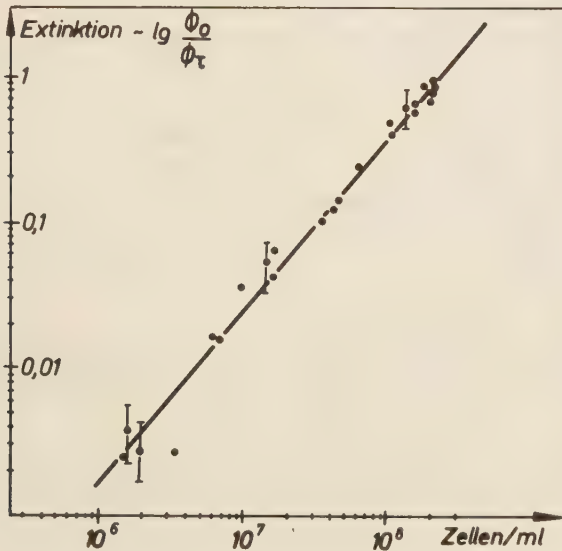


Abb. 6 Eichgerade für die Lichtleiteranordnung zur Messung der optischen Trübung im Kalorimeter

5.1.3 Eichung des Bestrahlungslichtleiters

Bestrahlungen mit den in 3.2 beschriebenen dünnen Lichtleitern ($\varnothing$ 3 mm) erwiesen sich als zu schwach, da die Bestrahlungsstärke am Objekt wegen des geringen Durchmessers zu niedrig war. Auch bei gleichzeitiger Anwendung von 4 Lichtleitern konnten nur bei dem extrem sensiblen Stamm S 2094 Bestrahlungszeiten unter 20 Minuten erreicht werden, während bei dem Wildstamm 211 selbst eine Zeit von 1 Stunde nur eine Abtötung auf 55 % brachte (s. Abb. 7). Bei den Kurven der Abb. 7 fällt der nach längerer Zeit waagerecht abknickende Teil auf, welcher wahrscheinlich auf bereits ablaufende Reparaturprozesse zurückzuführen ist.

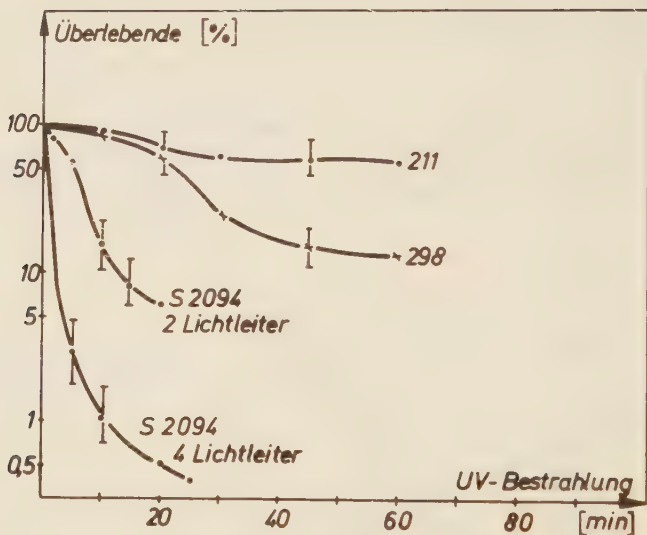


Abb. 7 Inaktivierungskurven für die Stämme 211, 298 und S 2094 mit zwei Lichtleitern ($\varnothing$ 3 mm) und für den Stamm S 2094 mit vier Lichtleitern

Wegen der besseren Durchlässigkeit wurde vorwiegend der größere Lichtleiter ($\varnothing$ 10 mm) für die Bestrahlungen im Kalorimeter benutzt. Die Bestrahlungsstärke wurde bei scharfer Abbildung der HNS-10/U Lampe auf die Oberfläche, 3 cm hinter der Austrittsfläche zu $2,3 \text{ erg/mm}^2 \cdot \text{s}$ bestimmt (Schaarschmidt 1970). Da die Bestrahlungen im Kalorimetergefäß aber unter grundsätzlich anderen Bedingungen erfolgten als bei den sonstigen Inaktivierungsversuchen, - nämlich kleinerer Ausstrahlungskegel, größere Schichtdicke, höherer Titer, - wurde eine "biologische Eichung" vorgenommen, indem einerseits die Inaktivierungskurve unter den üblichen Bedingungen mit einer HNS 10-Lampe, andererseits eine Inaktivierungskurve mit Lichtleitern unter den Bedingungen der Kalorimeterkammer aufgenommen wurde.

Aus der Abb. 8 erkennt man, daß die Bestrahlungszeiten im Kalorimeter etwa verdoppelt werden müssen (ca. 2,3-fach), um auf vergleichbare Abtötungssätze zu kommen.

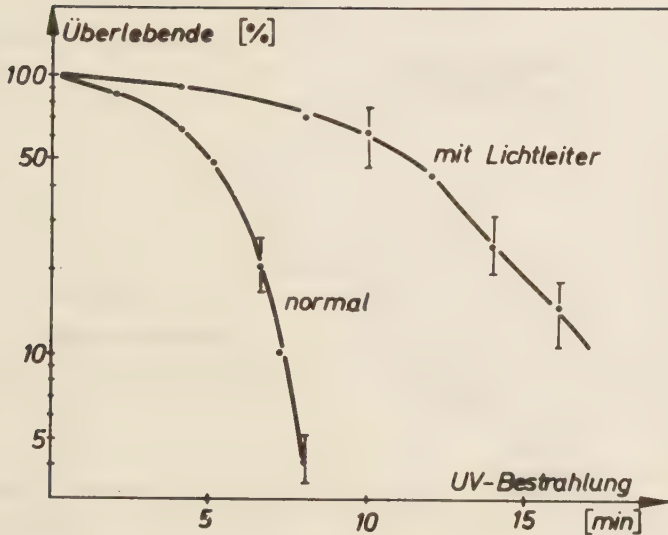


Abb. 8 Inaktivierungskurve mit dem großen Lichtleiter ($\varnothing$ 10 mm) im Vergleich zur Inaktivierungskurve ohne Lichtleiter in 42 cm Abstand von der Bestrahlungsampe (Stamm 211)

5.1.4 Kompensation der eingestrahltten Lichtenergie im Kalorimeter

Das durch den Lichtleitstab in die Kalorimeterkammer gestrahlte Licht wird vollständig absorbiert und zum Teil in Wärme umgesetzt. Diese Wärmeerzeugung beträgt bei einer Bestrahlungszeit von 10 Minuten etwa 3 mcal. Da dieser Wert durchaus in der Größenordnung der zu erwartenden Effekte liegt (Kap. 6.6), für die Gegenkammer aber kein zweiter Lichtleitstab zur Verfügung stand, wurde diese Strahlungsenergie durch elektrische Energie in der Gegenkammer kompensiert. Ein $100\ \Omega$ -Widerstand wurde in Uhu-plus eingebettet und am Rührer der Gegenkammer befestigt, die zur besseren Wärmeleitung mit Silikonöl gefüllt wurde. Durch mehrere Versuchsreihen wurden die Strom-Spannungswerte für den Widerstand so bestimmt, daß bei gleichen Zeiten gleiche Wärme in der Kammer und Gegenkammer erzeugt wurden. Die Abb. 9 gibt die Vergleichsgerade zwischen Bestrahlungswärme und Joulscher Wärme wieder.

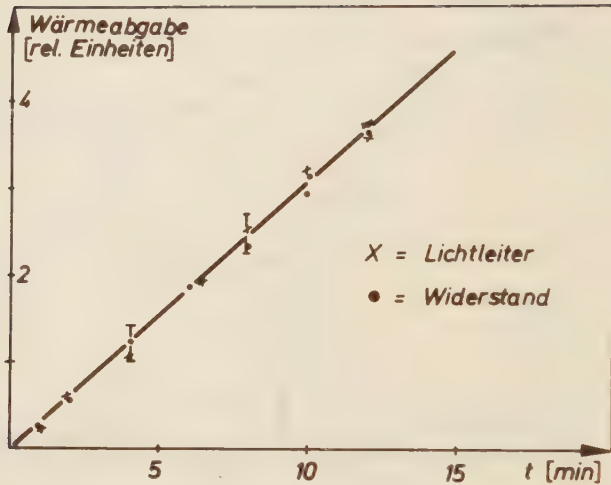


Abb. 9 Eichgerade zur Kompensation der Strahlungsenergie im Kalorimeter durch Wärmeerzeugung eines Widerstandes in der Gegenkammer

5.2 Wachstumsversuche

5.2.1 Wachstumsversuche ohne Bestrahlung

Nimmt man den Wärmefluß während der Zeit des Wachstums im Kalorimeter auf, so erhält man glockenförmige Thermogramme, deren Form abhängig ist von der Glucosekonzentration, der Temperatur, dem Anfangstitier und der Wachstumsgeschwindigkeit des verwendeten Stammes (Lamprecht e.a. 1971). Die insgesamt abgegebene Wärmemenge bleibt innerhalb der Fehlerschwankungen von $\pm 7\%$ aber konstant

$$Q = 25,2 \frac{\text{kcal}}{\text{Mol. Glucose}}$$

für alle verwendeten Stämme.

Die Auswertung der Thermogramme bringt wenig signifikante Unterschiede in Bezug auf die verwendeten Stämme. Es ist allgemein bekannt, daß strahlensensible Stämme von Hefen langsamer wachsen und kleinere Kolonien bilden als der Wildtyp. Deswegen scheint es sinnvoll, parallel zu den Thermogrammen das Wachstum durch Trübungsmessung zu verfolgen. Mit den in Kapitel 3.3 und 5.1.3 beschriebenen Lichtleiteranordnungen konnte dies synchron erfolgen. Abb. 10 gibt zwei sehr verschiedene Thermogramme wieder mit der zugehörigen Trübungskurve. Außerdem ist die integrierte Kalorimeterkurve, also die insgesamt abgegebene Wärme, aufgetragen. Nach Lamprecht (1969) können integrierte Wachstumsthermogramme ungerührter Hefekulturen mit der logistischen Funktion* beschrieben werden. Man erkennt aus der Abweichung der beiden sigmoiden Kurven der Abb. 10, daß das für gerührte Kulturen nicht gilt. Die Stelle der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit (Wendepunkt) liegt nicht bei dem Wert des halben Endtiters.

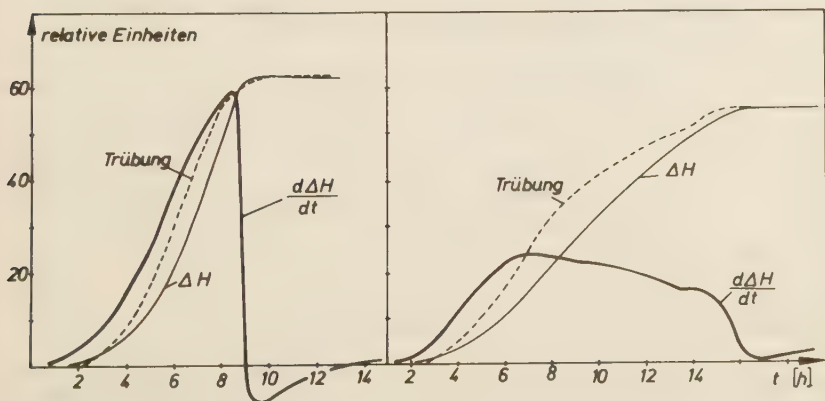


Abb. 10 Verschiedene Messungen einer Wachstumskurve. Wärme flu ß kurve $d\Delta H/dt$ und integrierte Kurve ΔH im Vergleich zu einer Trübungsmessung

*
$$N(t) = \frac{k \cdot N_0 \cdot e^{kt}}{k + m \cdot N_0 (e^{kt} - 1)}$$
 (N = Individuenzahl; $N_0 = N(t=0)$; k und m sind Wachstumskonstanten)

Aus dem linearen Teil der Trübungskurven erhält man die Wachstumsgeschwindigkeit oder die Generationszeit (Verdoppelungszeit) t_g (Zusammenhang: $t_g \cdot k = \ln 2$), die in Abb. 11 für verschiedene Glucosekonzentrationen aufgetragen ist.

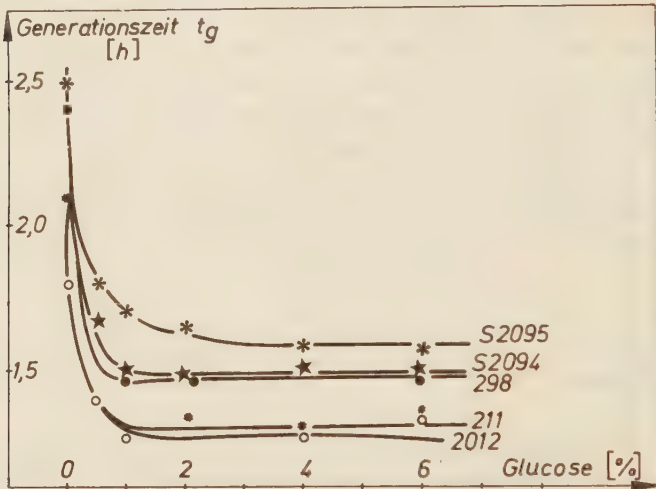


Abb. 11 Die Abnahme der Generationszeit mit steigender Glucosekonzentration für die strahlensensiblen Diplonten

5.2.2 Wachstumsversuche nach vorheriger Bestrahlung

Lamprecht (1969) konnte eine Veränderung der Form der kalorimetrischen Wachstumskurven von der vorher applizierten Dosis finden (s. Abb. 12).

Durch die Bestrahlung wird eine bestimmte Anzahl von Zellen abgetötet. Die Kurven der Abb. 12 sind deshalb auf gleichen Anfangstitern lebender Zellen bezogen, d.h. das Vermögen, eine makroskopische Kolonie zu bilden. Abtötung im Sinne der Koloniebildung bedeutet nicht völligen Stillstand des Stoffwechsels, denn geschädigte Zellen können noch wachsen und einige Zellteilungen ausführen, die selbstverständlich als Wärmetönung im Kalorimeter angezeigt werden. Die Kurven längerer Bestrahlungszeiten

haben daher einen höheren, steileren Verlauf, weil der wärmeproduzierende Anfangstiter auch viel höher ist als die Zahl der lebenden (koloniebildungs-fähigen) Zellen.

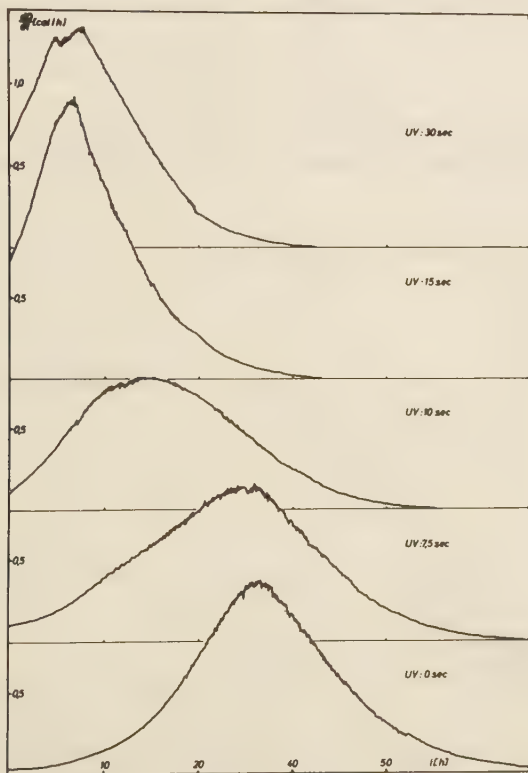


Abb. 12 Dosisabhängigkeit der kalorimetrischen Wachstumskurven bei gleichem Anfangstiter (nach Lamprecht 1969)

Der Verlauf der Trübungskurven bestrahlter Zellen ist, abgesehen von einer dosisabhängigen Verlängerung der lag-Phase, nicht zu unterscheiden von denen unbestrahlter Zellen.

5.2.3 Wachstumskurven bei zwischenzeitlicher Bestrahlung

Durch die in Kapitel 3.3 und 5.1.3 beschriebene Anordnung ist es möglich, eine wachsende Kultur zu einem beliebigen Zeitpunkt zu bestrahlen. Die Glockenform des Thermogrammes wird dabei unterbrochen und je nach applizierter Dosis tritt eine lag-Phase auf, der dann eine Fortführung des glockenförmigen Verlaufs erfolgt (siehe Abb. 13). Die Trübungskurve wird durch die Bestrahlung ebenfalls von einer kleinen Stufe unterbrochen. Die auftretenden Unregelmäßigkeiten sind jedoch nicht signifikant für den verwendeten Stamm.

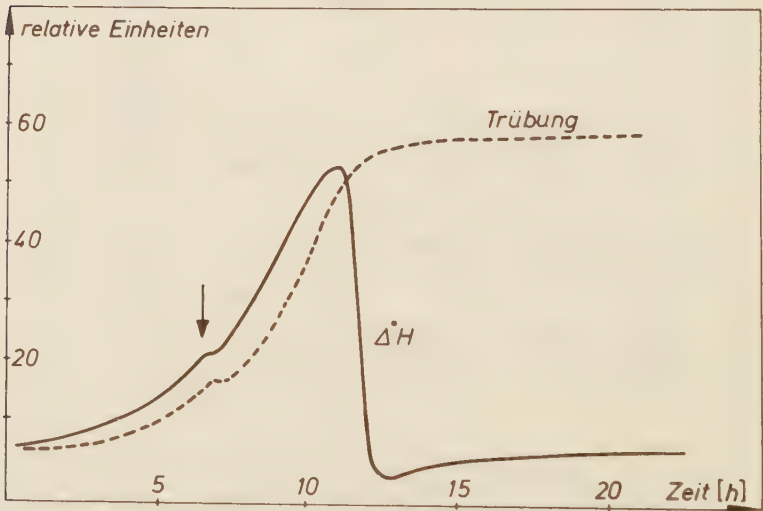


Abb. 13 Wärmeflußkurve $d\dot{H}/dt$ und zugehörige Trübungskurve einer wachsenden Kultur bei einmaliger Bestrahlung im Kalorimeter. Der Pfeil kennzeichnet den Bestrahlungszeitpunkt (Stamm 2105, 15 Minuten UV)

5.3 Dosiseffektkurven

5.3.1 Inaktivierungsversuche

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Reihe von Stämmen unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit und unterschiedlichen Dunkelreparaturvermögens ausgewählt (s. Tab. 2 und Kap. 4.1).

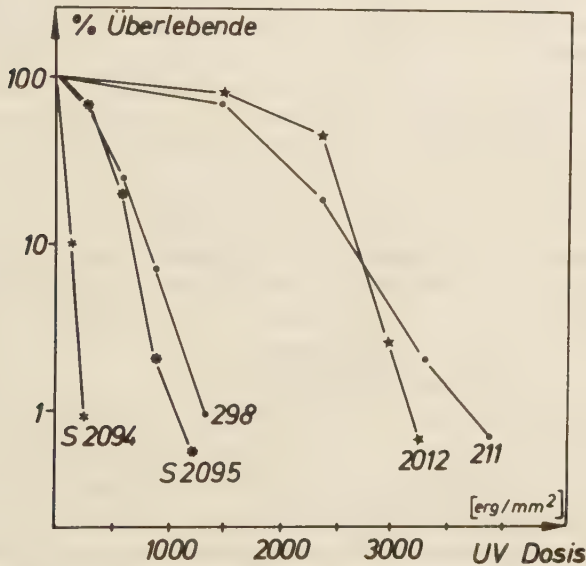


Abb. 14 Inaktivierungskurven der strahlensensiblen Diplonten 211, 2012, 298, S 2094 und S 2095

Die Abb. 14 gibt den Vergleich der Überlebenskurven wieder. Die Stämme 211 und 2012 sind zwei sich ähnlich verhaltende Wildtypen, während Stamm 298 das UV-empfindlichkeitsbestimmende Gen r_1^s und Stamm S 2094 das extrem sensible Gen r_{3-2}^s enthalten. Letzteres wirkt sich auch in dem negativen Dunkelreparaturvermögen aus.

Die Tabelle 4 zeigt die Strahlenempfindlichkeiten und das Dunkelreparaturvermögen der verwendeten diploiden Mutanten (die Werte sind zum Teil nach Averbeck 1970).

Tabelle 4

STRAHLENEMPFINDLICHKEIT DER DIPLOIDEN MUTANTEN

Stamm	211	2012	298	S 2095	S 2094
Gen-Symbol	++	++	$r_1^s r_1^s$	$r_2^s r_2^s$	$r_{3-2}^s r_{3-2}^s$
DRF	1,0	0,9	1,8	2,2	14,5
DMF	1,20	1,24	1,63	1,52	0,94

Der Dosisreduktionsfaktor DRF ist das Verhältnis der letalen Dosis LD des Wildstammes zu der der Mutante bei einer bestimmten Abtötungsrate (z.B. 10 %):

$$DRF_{10} = \frac{LD_{10} \text{ Wildtyp}}{LD_{10} \text{ Mutante}}$$

Der Dosisreduktionsfaktor ist ein Maß für die Strahlenempfindlichkeit bzw. Resistenz und läßt Vergleiche zwischen verschiedenen Stämmen zu.

Der Dosismodifikationsfaktor DMF ist definiert als das Verhältnis der letalen Dosis mit Reaktivierung zu der ohne Reaktivierung bei einem bestimmten Abtötungsprozentsatz.

$$DMF_{10} = \frac{LD_{10} (+ \text{ Reaktivierung})}{LD_{10}}$$

Der Dosismodifikationsfaktor ist ein Maß für das Reaktivierungsvermögen eines Stammes nach Bestrahlung. Auch er läßt Vergleiche zwischen verschiedenen Stämmen zu.

5.3.2 Reaktivierungsverhalten mit Glucosezusatz

Um Aussagen über die Energieverhältnisse bei der Dunkelreparatur machen zu können, schien es sinnvoll, vorab bzw. parallel zu den Kalorimeterversuchen den Einfluß einer Energiequelle auf die Dunkelreparatur zu überprüfen. Nach einigen orientierenden Vorversuchen wurde Glucose als energiereiche Verbindung ausgewählt, da deren Zugabe deutliche Effekte zeigte und gegenüber anderen Stoffen wie ATP, DNS-Basen oder Nucleotiden bessere und genauere Rückschlüsse auf das Reparatursystem zuläßt. Denn Glucose muß erst über den gesamten Stoffwechsel verarbeitet werden, während ATP oder fertige Nucleotide direkt von der Zelle in die Reparaturprozesse eingeschleust werden können, und damit das eigentliche Reaktivierungsvermögen der Zelle, nämlich alle Schritte des Reparaturmechanismus durchzuführen, verwischt wird.

Bei den Ausplattungsversuchen zur Ermittlung des Koloniebildungsvermögens nach Dunkelreparatur werden die Zellen nach der Bestrahlung für eine gewisse Zeit in flüssigem Puffermedium aufbewahrt (Liquid-Holding-Recovery). Nach 48 Stunden wird maximale Dunkelreaktivierung erreicht. Glucosezusätze stellen eine zusätzliche Energiequelle dar, die jedoch nicht zur Teilung der Zelle führt, da kein verwertbarer Stickstoff zur Verfügung steht. Den Effekt des Glucosezusatzes zeigen die Abb. 15 bis 19.

Außer bei dem Stamm S 2094, der einen negativen LHR-Effekt schon bei 0 % Glucosezusatz (Puffer) zeigt, wirken geringe Zusätze stets reaktivierend. Während ein Zusatz, der insgesamt eine 2 %ige Lösung ausmacht - in Vollmedium beträgt die Glucosekonzentration auch 2 % -, eine sehr viel geringere Erhöhung zeigt und bei dem Stamm S 2095 sogar zu einem negativen Effekt führt.

In Abschnitt 6.3 sollen die Ergebnisse im Zusammenhang mit den einzelnen Schritten der Dunkelreparatur diskutiert werden.

Die obigen Reaktivierungsversuche sind sowohl bei Bestrahlung als auch bei der anschließenden Pufferhaltung mit verschiedenen Zellditern durchgeführt worden. Zum Vergleich muß dann die Glucosekonzentration als Glucoseangebot pro Zelle angegeben werden. Es wurde auf einen Titer

$> 5 \cdot 10^5$ Zellen/ml geachtet, bei denen noch keine Abschattungseffekte bei Bestrahlung auftreten. Außerdem ergibt eine höhere Zellkonzentration eine höhere Reaktivierungsrate (Lochmann e.a. 1971). Letzteres wird mit einer Korrektur des Dosismodifikationsfaktors durch Bezug auf die schon jeweils erhöhte Reaktivierungsrate ohne Glucosezusatz ausgeschaltet.

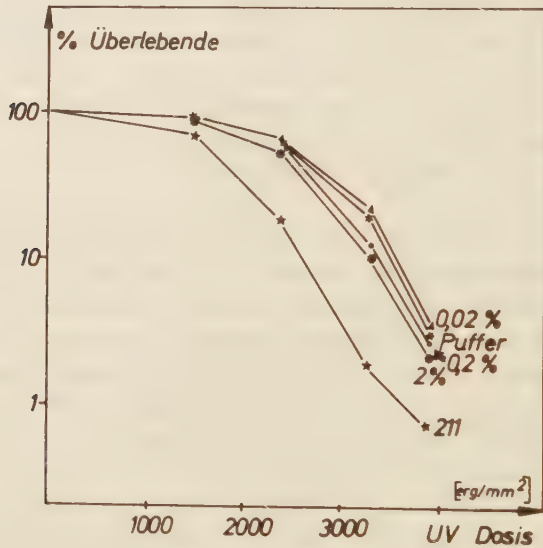


Abb. 15 Einfluß eines Glucosezusatzes (% Angaben) auf die Dunkelreaktivierung. Die Stammnummer 211 kennzeichnet die Inaktivierungskurve

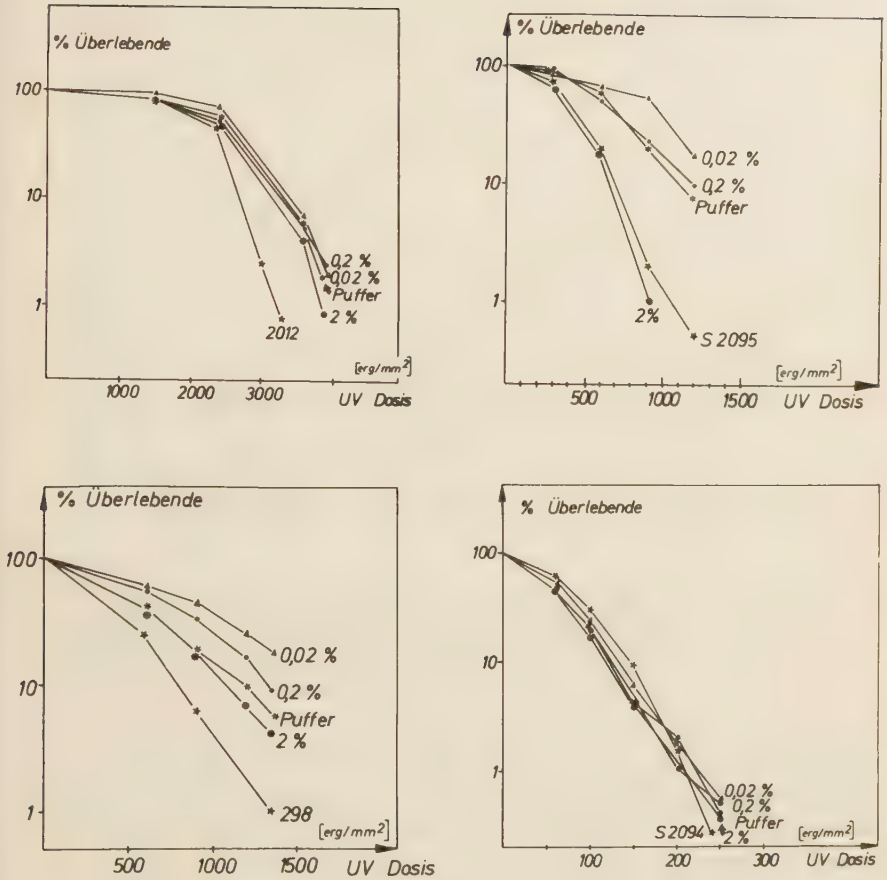


Abb. 16 - 19 Einfluß eines Glucosezusatzes (% Angaben) bei der dunkel-
reaktivierenden Pufferhaltung UV-bestrahlter Zellen. Die
Stammnummern 2012, S 2095, 298 und S 2094 stehen jeweils
an der Inaktivierungskurve ohne Dunkelreaktivierung

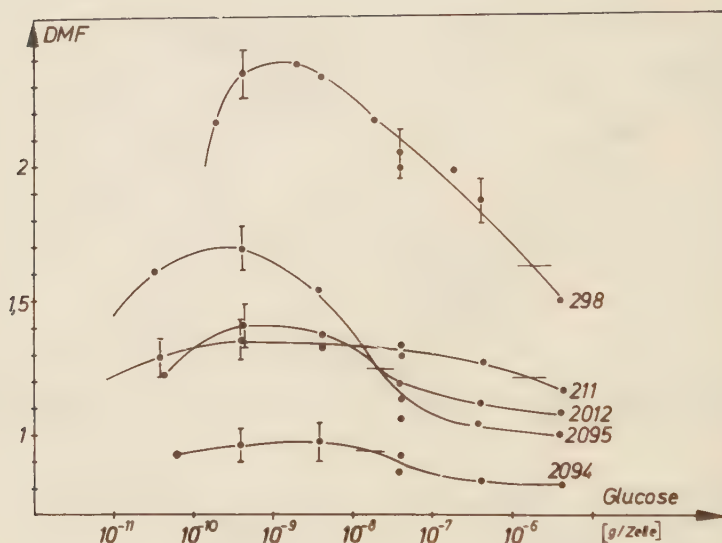


Abb. 20 Veränderung des Dosismodifikationsfaktors (DMF) mit der Glucosekonzentration des Reaktivierungspuffers für die Stämme 211, 2012, 298, S 2095, S 2094. Der Querstrich an den Kurven gibt den Wert für Puffer ohne Glucosezusatz an

Abb. 20 gibt schließlich die Veränderung des Reparaturverhaltens, angegeben als DMF, in Abhängigkeit von dem Glucoseangebot pro Zelle wieder. Man erkennt, daß in einem engen Konzentrationsbereich eine maximale Erhöhung des Reparaturvermögens für alle Stämme möglich ist, welches in seinem absoluten Wert aber stark abhängig von der verwendeten Mutante ist. Die in den einzelnen Kurven eingezeichneten kurzen Querstriche geben den DMF für 0 % (Puffer) an.

Bei allen Stämmen gibt es somit Glucosekonzentrationen, bei denen negative (relativ zu dem Wert für Puffer) LHR-Effekte auftreten. Absolut negative Reparaturerscheinungen treten nur bei dem Stamm S 2094 auf. Diese bleiben auch bei allen Glucoseangeboten erhalten.

Eine zeitliche Verfolgung des Reparaturgeschehens bei verschiedenen Glucosezusätzen kann Rückschlüsse auf den Mechanismus zulassen. Die obigen Resultate geben nur den maximalen Effekt nach 48 Stunden wieder. Da die deutlichste Steigerung der Reparaturrate bei dem Stamm 298 auftrat (s. Abb. 20), wurde mit diesem Stamm zu vier verschiedenen Zeiten das jeweilige Koloniebildungsvermögen gemessen.

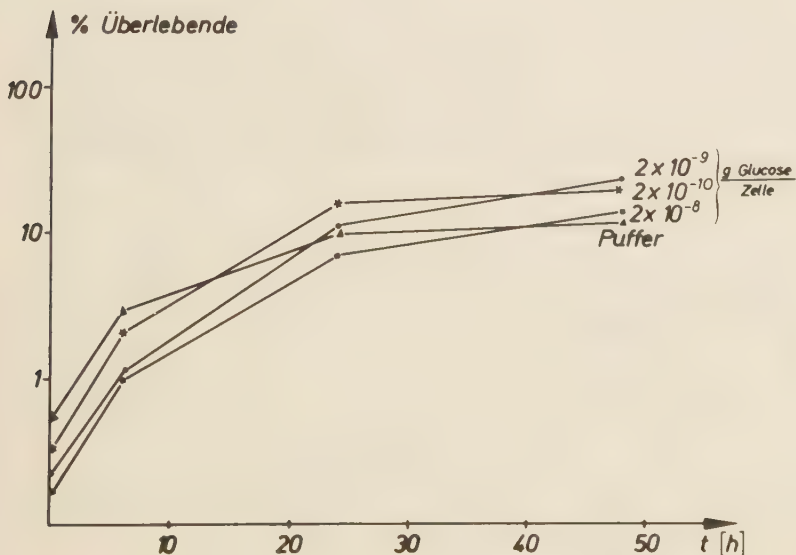


Abb. 21 Zeitabhängigkeit der Dunkelreaktivierung bei verschiedenen Glucosekonzentrationen (Stamm 298)

Abb. 21 zeigt das Ergebnis. Daran fällt auf, daß die Überlebenskurven für die verschiedenen Glucosezusätze nicht zu allen Zeiten parallel verlaufen, sondern daß sich erst nach 30 bis 40 Stunden eine Endverteilung einstellt, während zu Anfang alle Werte mit Zusatz unterhalb der Kontrolle (Puffer) liegen. Die Anfangspunkte (0 Stunden) liegen nicht zusammen, da ein Effekt insofern schon entsteht, als durch die Arbeitstechnik des Bestrahleins, der Glucosezugabe und des Ausplattens eine Zeitverzögerung von mindestens 10 Minuten entsteht, während der die Glucose schon von den Zellen aufgenommen wird. Rechnet man noch eine

gewisse lag-Phase der Zelle bis zu ihrem endgültigen Wachstumsbeginn auf der Vollmediumplatte hinzu, so kann 1/2 bis 1 Stunde Zeit für Reparaturprozesse und Wechselwirkungen mit der Glucose zur Verfügung stehen.

5.4 Betriebsstoffwechsel des Wildtypes

Werden Hefezellen in glucosefreiem Puffer gehalten, so findet kein Wachstum statt. Im Kalorimeter stellt man nur einen zeitlich konstanten Wärmefluß fest, der auf einen endogenen Betriebsstoffwechsel zurückzuführen ist. Die Größe dieses Wärmeflusses ist abhängig von der Anzahl der Zellen und beträgt beim Wildtyp 211 weniger als 10^{-10} cal/h.Zelle . Dieses Minimum an Stoffwechselarbeit hält an, so lange die Zelle noch innere Reserven verbrauchen kann. Sind diese erschöpft, so tritt eine Auflösung der Zelle und damit der Tod ein.

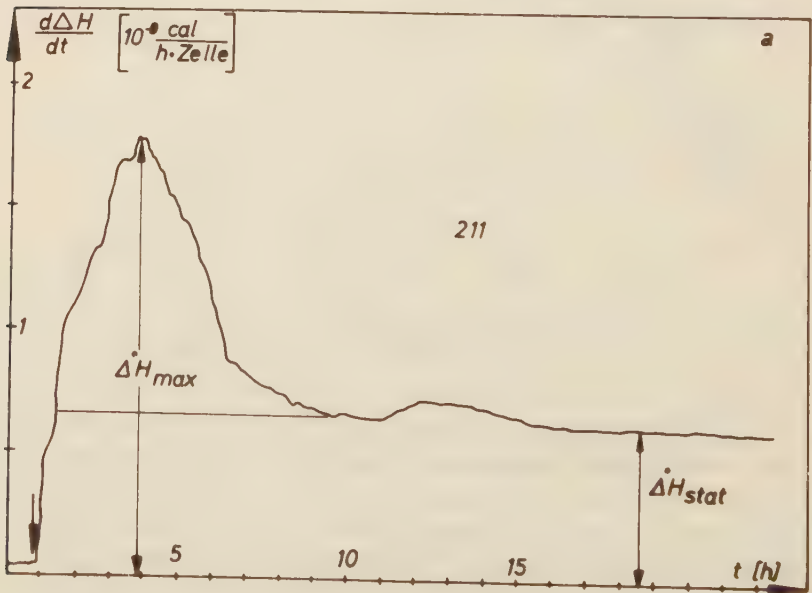


Abb. 22 Thermogramm des Betriebsstoffwechsels in Glucosepuffer (Stamm 211)

Befinden sich die Zellen in Puffer, dem Glucose zugesetzt ist, so resultiert ein wesentlich höherer Wärmefluß, der auf den Betriebsstoffwechsel der Zellen unter Metabolisierung der Glucose zurückzuführen ist. Als Thermogramm dieses Energieumsatzes ergibt sich eine charakteristische Kurve (Abb. 22), bestehend aus einem hohen Anfangsmaximum mit anschließendem Abfall auf einen längere Zeit konstanten Wert, der schließlich nach Verbrauch der Glucose auf fast Null abfällt.

Lamprecht (1969) bestimmt parallel zu den kalorimetrischen Messungen enzymatisch den Glucoseschwund im Medium und findet ein entsprechendes zeitliches Verhalten. In der vorliegenden Arbeit werden Parallelversuche durch Verfolgung radioaktiv markierter Glucose bei Aufnahme in Hefezellen durchgeführt (Kap. 5.10).

Das sofortige hohe Anfangsmaximum läßt sich gut auflösen, wenn die Glucose erst später dem Medium zugesetzt wird. In den folgenden Abbildungen kennzeichnet der kleine senkrechte Pfeil den Zeitpunkt der Glucosezugabe.

Der Umwandlungsquotient für Glucose in Wärme beträgt während des Betriebsstoffwechsels

$$Q = 26,8 \frac{\text{kcal}}{\text{Mol Glucose}} ,$$

der maximale Wärmefluß

$$\dot{\Delta H}_{\text{max}} = 2,04 \cdot 10^{-9} \frac{\text{cal}}{\text{h.Zelle}}$$

und der stationäre Endwert

$$\dot{\Delta H}_{\text{stat}} = 0,9 \cdot 10^{-9} \frac{\text{cal}}{\text{h.Zelle}} .$$

Die der Fläche, des über dem Endwert stehenden Teiles, des Anfangsmaximum entsprechende Wärmeabgabe beträgt

$$\text{Maximum} = 0,93 \cdot 10^{-8} \frac{\text{cal}}{\text{Zelle}}$$

Da dieses Maximum mit dem Auffüllen von Depots erklärt wird (Lamprecht 1969), war es interessant, die Abhängigkeit des Betriebsstoffwechsels von der angebotenen Glucosekonzentration und von der Wachstumsphase der Kultur zu erfahren.

Stellt man den Zellen weniger Glucose zur Verfügung, als dem Verbrauch im Anfangsteil entspricht, so bildet sich vorrangig das Anfangsmaximum aus und der stationäre Endwert fällt entsprechend kleiner aus. Es treten unter diesen Bedingungen vielfältige Kurvenformen auf, die nicht immer nach obiger Methode auszuwerten sind. Deshalb sind alle Versuche weit im Sättigungsbereich der Glucoseaufnahme durchgeführt worden. Unter diesen Bedingungen findet man keine Korrelation zwischen Depotbildung, $\Delta H_{\max}$ und der Glucosekonzentration.

Ein zeitlich enger Zusammenhang hingegen besteht zwischen der dem Maximum entsprechender Wärme und der Wachstumsphase der Zellkultur (siehe Abb. 23). Hier tritt ein deutlich schwächeres Maximum auf, wenn Zellen aus der Mitte der logarithmischen Phase entnommen werden, während Zellen aus der stationären Phase und der lag-Phase gleiche Werte ergeben.

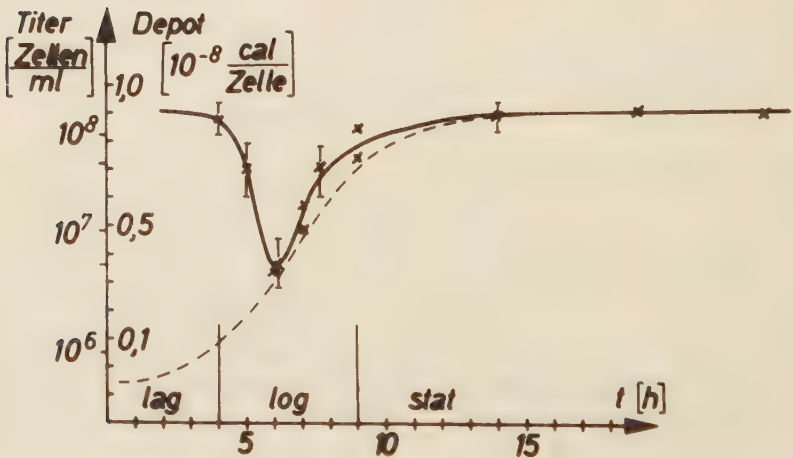


Abb. 23 Die Abhängigkeit des Anfangsmaximums des Betriebsstoffwechsels (Depot) von der Wachstumsphase der Zellpopulation. Die gestrichelte Kurve gibt die Trübung der wachsenden Kultur wieder.

Hingewiesen sei auch auf das Auftreten eines zweiten, kleineren Maximums (Nebenmaximum s. Abb. 22), welches im Abschnitt 5.9 zusammen mit einigen anderen, auffälligen Effekten behandelt wird.

5.5 Betriebsstoffwechsel der strahlensensiblen Mutanten

Unter denselben Versuchsbedingungen wie der Wildtyp wurde der Betriebsstoffwechsel der übrigen Stämme studiert.

Abb. 24a bis d zeigen die Thermogramme des Betriebsstoffwechsels der anderen Mutanten. Die Kurve des Stammes 2012 ähnelt sehr der des Stammes 211. Stamm S 2095 ergibt eine ähnliche Kurve mit etwas niedrigerem und breiterem Maximum. Das Thermogramm des Stammes 298 hat kein ausgeprägtes Anfangsmaximum, sondern die Kurve steigt sofort auf einen im Vergleich zu den anderen Stämmen wesentlich höheren Endwert an. Dieses Verhalten bringt Schwierigkeiten im Hinblick auf die Auswertung nach obigem Verfahren (Abb. 22). Auffallend ist auch die Kurve des Stammes S 2094, die überhaupt kein Maximum zeigt und nur ein flaches, ziemlich konstantes Niveau ergibt.

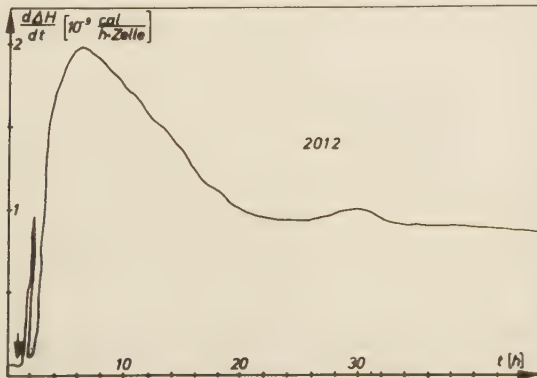


Abb. 24a Wärmeentwicklung beim Betriebsstoffwechsel von Hefezellen in Glucosepuffer (Stamm 2012). Der senkrechte Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Glucosezugabe.

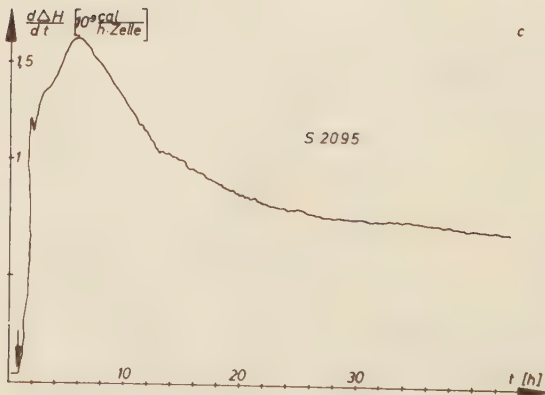
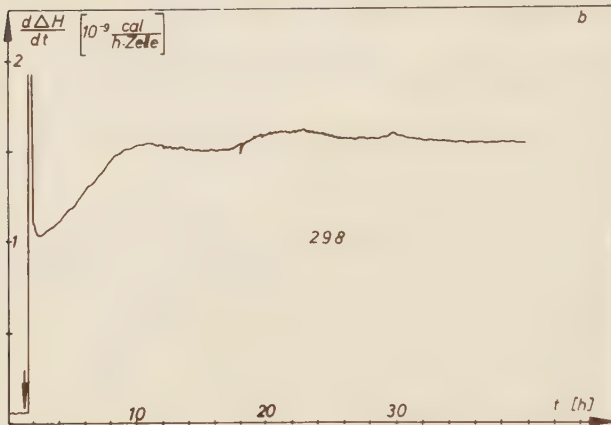


Abb. 24b + c Thermogramme des Betriebsstoffwechsels der Stämme 298 und S 2095 (s. auch Abb. 24a)

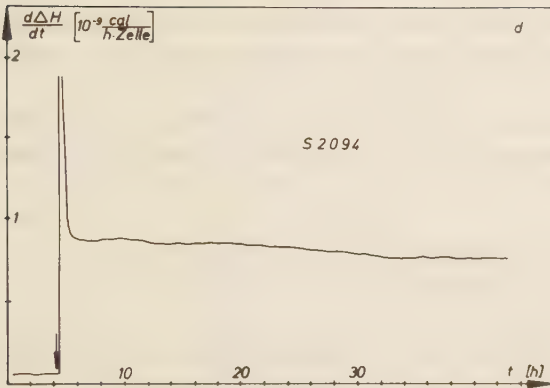


Abb. 24d Thermogramme des Betriebsstoffwechsels
des Stammes S 2094 (s. auch Abb. 24 a)

Tabelle 5

BETRIEBSSTOFFWECHSEL DER STRAHLENSENSIBLEN MUTANTEN

Stamm	211	2012	298	S 2095	S 2094
Maximum $\left[10^{-8} \frac{\text{cal}}{\text{Zelle}}\right]$	0,96	1,13	0,95	1,03	0,095
$\dot{\Delta H}_{\text{max}} \left[10^{-9} \frac{\text{cal}}{\text{h} \cdot \text{Zelle}}\right]$	1,76	2,01	1,56	1,6	1,3
$\dot{\Delta H}_{\text{stat}} \left[10^{-9} \frac{\text{cal}}{\text{h} \cdot \text{Zelle}}\right]$	0,93	1,11	1,34	1,17	0,69

Die Auswertung der Kurven nach Inhalt des Maximums, maximalen Wärmefluß $\dot{\Delta H}_{\text{max}}$ und stationären Endwert $\dot{\Delta H}_{\text{stat}}$ gibt Tabelle 5 wieder. Sie gibt Werte an, die aus jeweils mindestens zehn Kurven entnommen worden sind.

Auch für die strahlensensiblen Stämme ergibt sich eine Abhängigkeit des Betriebsstoffwechsels von der Wachstumsphase, denn in der Mitte der logarithmischen Phase treten deutlich niedrigere Maxima auf. In der lag-Phase und im stationären Bereich ergeben sich dann höhere Werte.

Eine Abhängigkeit der Kurven vom Zelltitler oder von der Glucosekonzentration konnte in den untersuchten Bereichen (10^6 bis 10^8 Zellen/ml und $3 \cdot 10^{-5}$ bis $1 \cdot 10^{-1}$ Mol Glucose) nicht festgestellt werden.

Die Umwandlungsquotienten von Glucose in Wärme sind innerhalb der Fehlergrenzen der Messung von $\pm 15\%$ für die einzelnen Stämme nicht verschieden.

5.6 Betriebsstoffwechsel unter N_2 - und O_2 -Atmosphäre

Der Betriebsstoffwechsel einer Zelle ist nur möglich unter dauerndem Energieaufwand, also Abbau einer Energiereserve in Form von Glucose, ATP und vor allem Glykogen. Es wird angenommen (Die Hefen 1960, S.361), daß das gespeicherte Glykogen im Hungerstadium veratmet wird, während die endogene Vergärung einen sehr viel geringeren Anteil ausmacht.

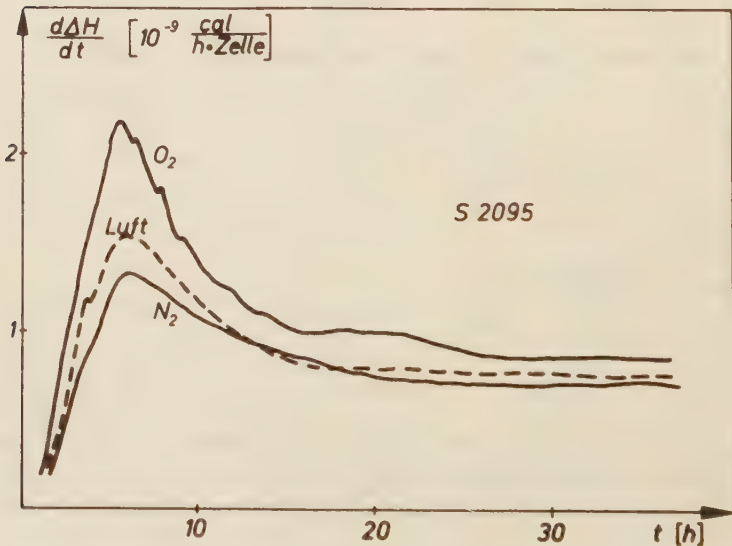


Abb. 25 Thermogramme des Betriebsstoffwechsels unter Sauerstoffdruck (2 kp/cm²) und Luftatmosphäre (Stamm S 2095)

Um den Einfluß von Gärung und Atmung auf den Betriebsstoffwechsel zumindest richtungsmäßig zu erfassen, wurde der Betriebsstoffwechsel unter Sauerstoff- bzw. Stickstoffdruck von 2 kp/cm^2 im Kalorimeter untersucht. Eine Druckabhängigkeit wurde nicht aufgenommen.

In Stickstoffatmosphäre werden die Thermogramme aller verwendeten Stämme flacher, weniger ausgeprägte Maxima und niedrigere Wärmeflüsse resultieren. Unter Sauerstoffatmosphäre ergeben sich hingegen noch ausgeprägtere Kurven als unter Luft. Die Enthalpieänderungen sind größer und sogar die Stämme 298 und S 2094 zeigen ein deutliches Maximum. Abb. 25 zeigt am Beispiel des Stammes S 2095 den Einfluß von O_2 und N_2 auf die Kurvenform. Hierbei ist auf die Spitzen im abfallenden Teil des Maximums der O_2 -Kurve hinzuweisen, auf die noch im Abschnitt 5.9.3 eingegangen wird. Die Veränderung der Wärmeflüsse im maximalen und stationären Bereich, sowie der dem Maximum entsprechende Energieinhalt wird durch Abb. 26 wiedergegeben.

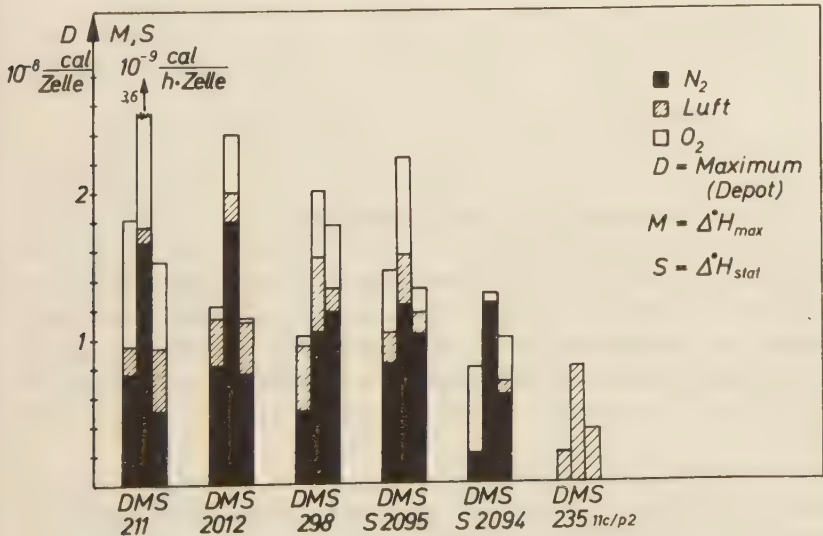


Abb. 26 Vergleich der Betriebsstoffwechselgrößen der Diplonten unter O_2 -, N_2 - und Luftatmosphäre und des Petites 235 11c/p2 in Luft. Die drei Größen D, M und S sind von der Nulllinie aus abgetragen.

Mittelt man über alle Stämme, so erhält man für die Größen des Betriebsstoffwechsels, also Anfangsmaximum und maximalen Wärmefluß und stationären Wärmefluß, etwa ähnliche Verhältnisse für die Werte unter Stickstoff zu Luft zu Sauerstoff, wie Tabelle 6 zeigt.

Tabelle 6

VERHÄLTNIß DER BETRIEBSSTOFFWECHSELGRÖßEN
UNTER O_2 , N_2 UND LUFT

	Stickstoff	Luft	Sauerstoff
Maximum	1	1,3	1,9
$\dot{\Delta H}_{\max}$	1	1,2	1,7
$\dot{\Delta H}_{\text{stat}}$	1	1,4	1,8

Mittelwert	1	1,3	1,8

Alle Angaben der Tab. 6 sind mit einem Fehler von $\pm 0,3$ behaftet.

5.7 Betriebsstoffwechsel bei Atmungsschädigung

Eine weitere Möglichkeit, den Zusammenhang zwischen Atmung und Betriebsstoffwechsel zu studieren, bieten sogenannte Petites-Stämme. Das sind Mutanten, die wegen plasmatischen oder genetischen Defektes ein reduziertes Atmungsvermögen besitzen. Außerdem besitzen Petites-Zellen keine Fähigkeit zur Dunkelreaktivierung (Zimmermann 1968, Averbek 1970).

Die zu den obigen Stämmen gehörigen Petites wurden durch Isolierung kleiner Kolonien und anschließender Prüfung des Wachstums auf Natriumlactatmedium gewonnen. Zum Vergleich wurde auch ein anderer Petites-Stamm 235 11c/p2 herangezogen.

Die Thermogramme sind sich alle sehr ähnlich, nur ein niedriges Maximum tritt auf und die Enthalpieänderungen sind gering.

Tabelle 7

BETRIEBSSTOFFWECHSEL VON ATMUNGSDEFEKTEN MUTANTEN

In Klammern die Werte der Normalstämme

Stamm	211p5	235-11c/p2	298p	2095p	2094p
Maximum					
$\left[10^{-8} \frac{\text{cal}}{\text{Zelle}}\right]$	0,23 (0,96)	0,2 (-)	0,13 (0,95)	0,12 (1,03)	0,04 (0,095)
ΔH_{max}					
$\left[10^{-9} \frac{\text{cal}}{\text{Zelle} \cdot \text{h}}\right]$	0,88 (1,76)	0,80 (-)	0,27 (1,56)	0,48 (1,6)	0,45 (1,3)
ΔH_{stat}					
$\left[10^{-9} \frac{\text{cal}}{\text{h} \cdot \text{Zelle}}\right]$	0,42 (0,93)	0,36 (-)	0,05 (1,34)	0,27 (1,17)	0,03 (0,69)

Ein Vergleich der Tabellen 5 und 7 zeigt einen deutlich reduzierten Betriebsstoffwechsel der Petites-Stämme. Der Vergleich einzelner Werte ist nur beschränkt möglich, da die Werte der Petites stark abhängig sind vom Ausmaß der Atmungsdefizienz, welche wiederum nur mit einer manometrischen Methode nach Warburg bestimmt werden könnte.

Die Abb. 27 verdeutlicht am Beispiel des Stammes 298 den Einfluß des Atmungsdefektes auf den Betriebsstoffwechsel.

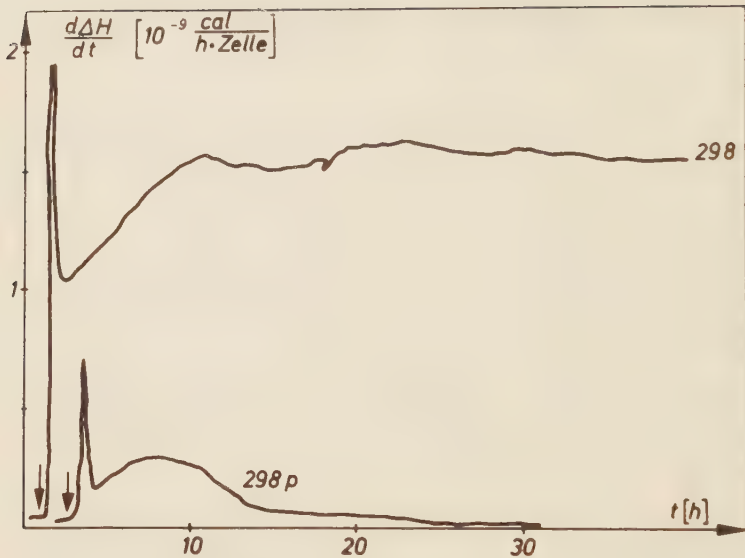


Abb. 27 Thermogramm des Betriebsstoffwechsels eines Petites-Stammes im Vergleich zu seinem atmungskompetenten Stamm, beide Stämme in Glucosepuffer (Petites = 298p)

Einfluß von Atmungsgiften

Eine Reihe von Chemikalien wirken schon in geringer Konzentration stark hemmend auf die Atmung, da sie entweder direkt die Atmungsenzyme blockieren (Natriumarsenat) oder in die DNS eingelagert werden (Farbstoffe) und deren Wirkungsweise verändern. Da diese Gifte teilweise auch auf die Dunkelreaktivierung wirken, schien es sinnvoll, ebenfalls den Einfluß auf den Betriebsstoffwechsel zu prüfen.

Bei allen Versuchen ergibt sich eine deutliche Hemmung, und die zugehörigen Thermogramme sind noch weniger profiliert als die der atmungsdefekten Mutanten.

Abb. 28 zeigt das Thermogramm des Stammes 211, dem nachträglich der Farbstoff Acriflavin zugegeben wurde. Kurz nach der Zugabe zeigt das Thermogramm eine exotherme Reaktion, die mit der Bindung des Farbstoffes an Zellkomponenten erklärbar ist. Nach etwa einer Stunde läßt dann der Wärmefluß stark nach, um sich auf ein geringes Niveau einzustellen.

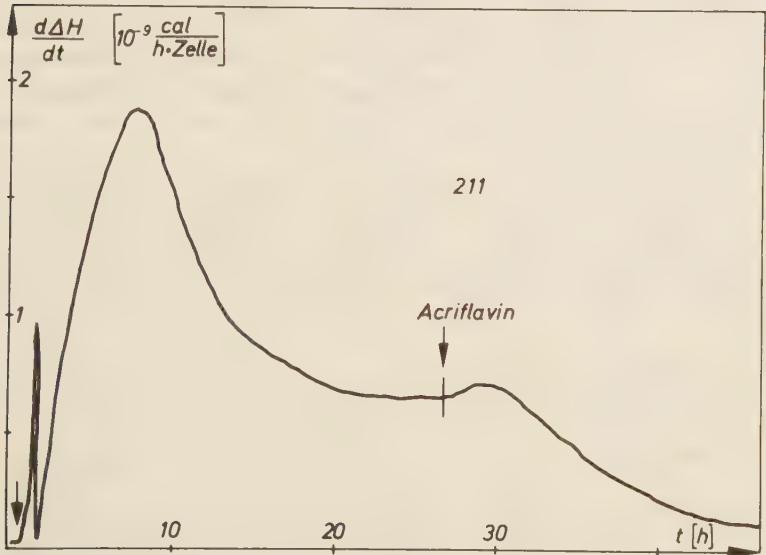


Abb. 28 Thermogramm des Betriebsstoffwechsels bei Einwirkung eines Atmungsgiftes (Acriflavin), Stamm 211

Wird das Zellgift schon zu Anfang, zusammen mit der Glucose angeboten, so ergeben sich ganz flache Maxima, d.h. nur konstante Wärmeflüsse. Tabelle 8 gibt die erhaltenen Werte für einige Gifte wieder.

Tabelle 8

BETRIEBSSTOFFWECHSEL BEI ZUGABE VON ATMUNGHEMMSTOFFEN
In Klammern die Werte ohne Hemmstoff

Stamm	211	2012	S 2095	298
Hemmstoff	Thiopyronin 5,ug/ml	Acridingelb 7,1,ug/ml	Acriflavin 5,ug/ml	Natriumarsenat 7,8,ug/ml
Maximum $\left[10^{-8} \frac{\text{cal}}{\text{Zelle}}\right]$	0,10 (0,96)	0,49 (1,13)	0,10 (1,03)	0,15 (0,95)
$\dot{\Delta H}_{\text{max}}$ $\left[10^{-9} \frac{\text{cal}}{\text{hZelle}}\right]$	0,47 (1,76)	0,17 (2,01)	0,12 (1,6)	0,20 (1,56)
$\dot{\Delta H}_{\text{stat}}$ $\left[10^{-9} \frac{\text{cal}}{\text{hZelle}}\right]$	0,47 (0,93)	0,11 (1,11)	0,12 (1,17)	0,18 (1,34)

5.8 Betriebsstoffwechsel nach Bestrahlung

Lamprecht (1969) konnte bei einem haploiden Hefestamm nach Röntgen- oder UV-Bestrahlung keine Veränderung des Betriebsstoffwechsels in Glucosepuffer feststellen. Das Maximum und der stationäre Endausschlag im Kurvenverlauf waren nicht variiert. Diese Beobachtungen wurden durch eigene Untersuchungen an mehreren Stämmen bestätigt.

Werden Hefezellen außerhalb des Kalorimeters bestrahlt und anschließend in Glucosepuffer inkubiert und der Betriebsstoffwechsel im Kalorimeter untersucht, so sind keine signifikanten Unterschiede in der Form des Ther-

mogrammes zu erkennen. Nur die Kurvenlinie selbst ist sehr viel unruhiger und weist eine größere Breite auf.

Bei der Auswertung der Thermogramme ergeben sich sehr viel höhere Werte für das Maximum und die Wärmeflüsse, wenn man diese auf die Zahl der überlebenden Zellen bezieht, die man nach Ausplattung und Auszählung der Kolonien erhält. Da die Bestrahlungsdosen so gewählt waren, daß Abtötungen bis auf 1 % Überlebende auftraten, ergeben sich Werte, die um Zehnerpotenzen über denen unbestrahlter Kulturen liegen. Nach Arbeiten von Hempel e.a. (1964) werden bei Hefen aber Stoffwechselprozesse wie Gärung und Atmung erst bei sehr viel höheren Dosen (Abtötung auf 10^{-5}) geschädigt.

In den vorliegenden Untersuchungen treten daher nahezu keine abgetöteten Zellen im Sinne des Betriebsstoffwechsels auf, so daß alle Werte auf 100 % Überlebende bezogen werden können. Auf dieser Grundlage ergeben sich für das Maximum und $\dot{\Delta H}_{\max}$ keine Veränderungen, nur die stationären Werte $\dot{\Delta H}_{\text{stat}}$ sind leicht erhöht (Tabelle 9).

Tabelle 9

STATIONÄRER BETRIEBSSTOFFWECHSEL MIT UND OHNE BESTRAHLUNG

Stamm	211	298	S 2095	S 2094
$\dot{\Delta H}_{\text{stat}}$ ohne UV	0,93	1,34	1,17	0,69
$\dot{\Delta H}_{\text{stat}}$ mit UV	0,96	1,46	1,20	0,69
$[10^{-9} \text{ cal/h.Zelle}]$				

Die Differenzen zwischen den Werten mit und denen ohne Bestrahlung sind sehr gering und liegen zum Teil noch im Bereich der Fehlergrenzen. Die Tendenz einer Erhöhung des Wärmeflusses ist jedoch immer erhalten. Um diese erhöhte Wärmeabgabe, die eventuell als Ablauf von Reparaturprozessen gedeutet werden können, besser zu erfassen, wurden die Zellen nicht

vorher bestrahlt, sondern erst im Kalorimeter mit Hilfe der oben beschriebenen Lichtleiteranordnung (Kapitel 3.3 und 5.1.3).

Es hat sich gezeigt, daß der günstigste Bestrahlungszeitpunkt nach dem Aufnahmemaximum der Glucose liegt, also wenn der Betriebsstoffwechsel im stationären Bereich verläuft, denn die leichte Erhöhung des Wärme- flusses nach der Bestrahlung hebt sich besser über dem konstanten Ver- lauf des stationären Teiles ab als über dem sehr hohen Bereich des Maximums. Außerdem hat die Ausbildung des Maximums einen Einfluß auf die Rate des Anstieges.

Tabelle 10 gibt die nach Bestrahlung erhaltenen Erhöhungen von ΔH_{stat} und die zusätzliche abgegebene Wärme an.

Tabelle 10

WÄRMEABGABE UND ERHÖHUNG DES WÄRMEFLUSSES NACH BESTRAHLUNG
(Abtötung auf 20 %)

Stamm	211 (30 %)	211 (20 %)	2012	298	S 2095	S 2094
Wärmeabgabe						
$\left[10^{-11} \frac{\text{cal}}{\text{Zelle}}\right]$	6	12	10	16	11	~1
Wärmefluß						
$\left[10^{-9} \frac{\text{cal}}{\text{h} \cdot \text{Zelle}}\right]$	0,03	0,08	0,05	0,09	0,08	0,01

Die Werte der Tabelle 10 sind sehr klein und stark fehlerbehaftet. Sie sind daher nur beschränkt übertragbar und sollen nur eine Richtung auf- weisen. Im Abschnitt 6.6 sollen sie zur Abschätzung der Reparaturpro- zesse verwendet werden.

Eine Dosisabhängigkeit konnte aus experimentellen Gründen nicht aufge- nommen werden, da wegen der geringen Durchlässigkeit des Lichtleiters die Bestrahlungszeiten bis zu mehreren Stunden hätten ausgedehnt werden

müssen (Kapitel 5.13), um eine Abtötung auf 1 % zu erreichen. Mit dieser langen Zeit werden Fehler durch die Kompensation der Bestrahlungswärme (Kapitel 5.1.4) eingebracht, die über dem tatsächlichen Versuchseffekt liegen. Es konnten daher nur orientierende Versuche gemacht werden. Diese lassen eine Abhängigkeit von der Dosis erkennen (s. Stamm 211 in Tab. 10). Petites-Stämme und atmungsaktive Stämme unter Zusatz von Acriflavin und Thiopyronin ergaben keine Erhöhung des Betriebsstoffwechsels nach Bestrahlung. Im letzteren Falle resultierte sogar eine Erniedrigung, die durch einen photodynamischen Effekt erklärt werden kann.

5.9 Besondere Effekte in den Thermogrammen des Betriebsstoffwechsels

5.9.1 Nebenmaximum

Schon in den Abb. 18, 20a, 21 ist auf das Auftreten eines deutlichen Nebenmaximums nach dem ersten großen Maximum hingewiesen worden. Dieses zweite Maximum tritt in 50 % der Fälle auf und in weiteren 30 % der Fälle andeutungsweise auf (siehe Abb. 29). Sowohl das Verhältnis der den Maxima entsprechenden Energiebeträge als auch das Verhältnis der Höhen der Maxima ist abhängig von dem Glucoseangebot pro Zelle. Beide Werte erreichen aber mit steigender Glucosekonzentration einen Maximalwert von 0,6 wie Abb. 30 zeigt.

Der zeitliche Abstand der Maxima schwankt zwischen 500 und 900 Minuten und beträgt im Mittel 720 Minuten.

Das Nebenmaximum tritt auch auf bei den Stämmen 2012 und S 2095, aber nicht beim Stamm S 2094.

Lamprecht* findet ähnliche Nebenmaxima beim Wachstum in ungerührten Medien, und er deutet das weitere Auftreten von Maxima als Schwingungen im Diffusionsverhalten des Systems. Dieser Deutung würde auch die Beobachtung entsprechen, daß das Nebenmaximum im Thermogramm des Betriebsstoffwechsels bei gleichzeitigem Rühren nicht auftritt. Denn bei guter

* Persönliche Mitteilung

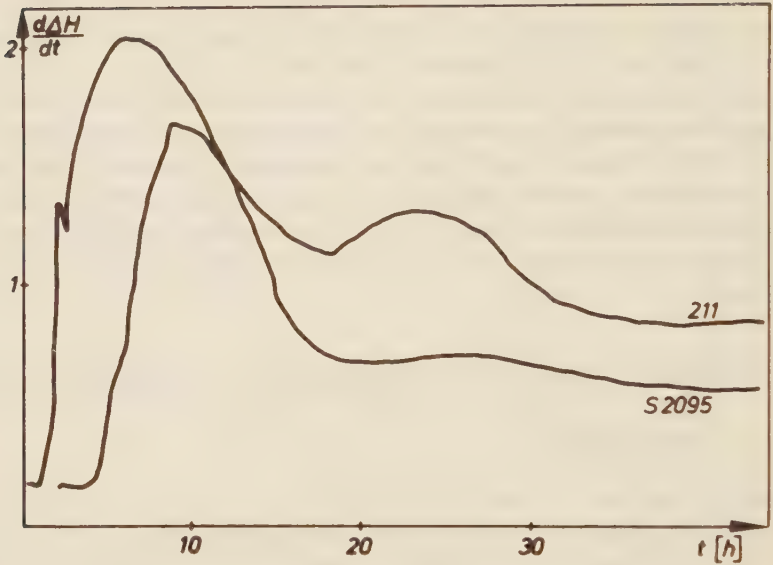


Abb. 29 Das Auftreten eines kleinen Nebenmaximums während des Betriebsstoffwechsels einer ungerührten Kultur (Stämme 211 und S 2095)

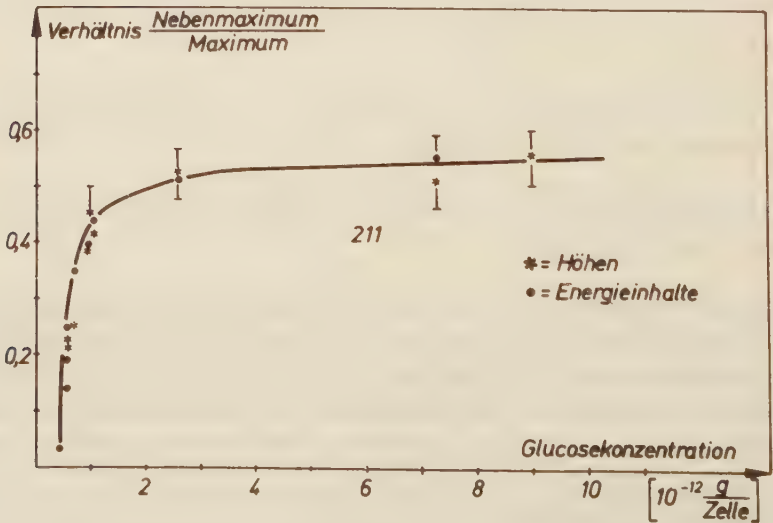


Abb. 30 Das Verhältnis der Flächen (Energieinhalte) und Höhen (Wärmeflüsse) von Nebenmaximum und Maximum in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration

Durchmischung ist jederzeit die Glucosekonzentration im gesamten Medium gleich, so daß bei Verbrauch durch die Zellen keine lokalen Bereiche verminderter Glucosekonzentration entstehen. Es kann zur Zeit noch nicht erklärt werden, warum nur ein Nebenmaximum auftritt, obwohl, in den optimalen Fällen eines großen Nebenmaximums, experimentell ein entsprechend kleineres, zweites Nebenmaximum nachgewiesen werden könnte. Weiterhin kann nicht erklärt werden, warum das Nebenmaximum nicht in allen Fällen auftritt, obwohl die Glucosekonzentration ausreichen würde.

5.9.2 Einstoßpeak

Ein großer Teil der Versuche zum Betriebsstoffwechsel in Glucosepuffer wurde so ausgeführt, daß die Glucose erst nachträglich, d.h. nach Temperaturengleich der Meßkammern im Kalorimeter, zu dem System gegeben wurde. Das hatte einmal den Vorteil, daß die Nulllinie gleich zu Anfang des Versuches erhalten wurde, und zum anderen, daß das Maximum voll auflösbar war. Die Glucosezugabe durch Einstoßen kleiner Töpfchen vom Deckel der Reaktionskammern in den Kammerinhalt ist sicherlich eine Störung des Systems, die durch eine Wärmeabgabe (Reibung) auf dem Thermogramm sichtbar ist. Durch gleichzeitige Zugabe in der Gegenkammer, kann dieser Effekt klein gehalten werden, so daß er im Vergleich zu dem nachfolgenden Versuchseffekt vernachlässigbar ist. Trotzdem ist auf den Thermogrammen, siehe z.B. Abb. 24, 27, 28, eine deutliche Spitze kurz nach Zugabe der Töpfchen zu erkennen, die zunächst als Reibungswärme beim Einstoß gedeutet wurde. Mit der Zahl der Versuche aber zeigte sich, daß der Einstoßpeak in der Mehrzahl der Fälle (85 %) exotherm war. Bei reiner Reibungswärme aber hätten statistisch genau so viele endotherme wie exotherme Peaks auftreten müssen. Die Wärmeabgabe muß also aus dem System selbst entstanden sein, was noch dadurch verdeutlicht wird, daß manchmal durch das Einstoßen tatsächlich ein Peak nach unten entsteht, der aber sofort umkehrt und sich nach oben ausbildet (Abb. 30). Blindversuche (ohne Zellen) ergaben tatsächlich eine symmetrische Verteilung der Peaks nach oben und unten und wesentlich geringere Höhen. Die Abbildung 31 zeigt den Verlauf des Einstoßpeaks in einer größeren Zeitauflösung.

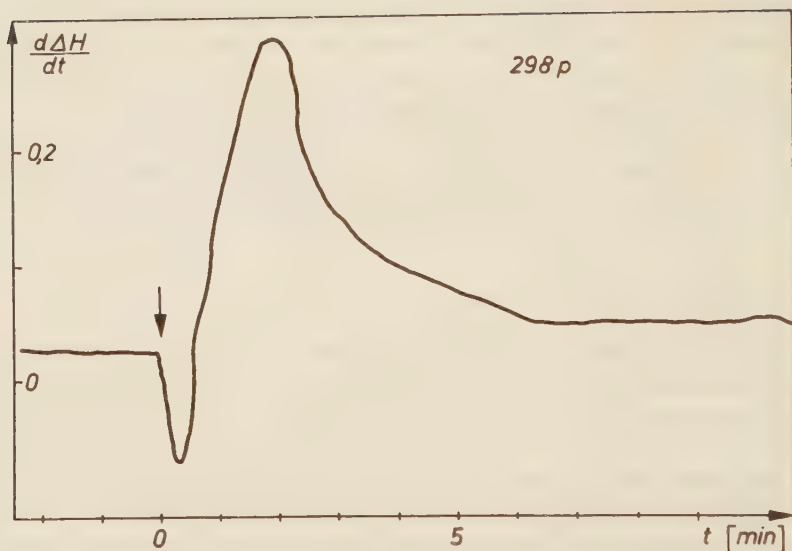


Abb. 31 Kurzzeitiges Maximum nach Zugabe der Glucose (Pfeil) und durch Reibung entstandenes Minimum (Stamm 298p). Der Zeitmaßstab ist stark gespreizt.

Die Einstoßspitzen treten bei allen Stämmen auf, einschließlich atmungsdefekter. Wegen der Trägheit des Kalorimeters gelingt es nicht, die Funktion völlig aufzulösen, sondern man erhält nur eine zeitlich verwaschene Funktion. Die Dauer bis zum völligen Abklingen liegt zwischen 5 und 50 Minuten, im Durchschnitt bei 16 Minuten. Allerdings sind diese Werte mit sehr großen Fehlern behaftet, da das zeitliche Ende des Peaks schon im ansteigenden Bereich des großen Maximums liegt. Die Zeit bis zum Erreichen des Maximums ist hingegen immer abzulesen und liegt im Durchschnitt bei 2,7 Minuten, wobei auch hier größere Schwankungen auftreten. Eine Abhängigkeit von der Glucosekonzentration, dem Zelltitert und der Art des Stammes war wegen der Schwankungen nicht evident und sind deshalb nicht genauer untersucht worden. Die Höhen der Spitzen betragen im Mittel $2,5 \cdot 10^{-9}$ cal/h·Zelle. Im Abschnitt 6.4 wird das Auftreten einer Anfangsspitze mit dem mehrphasigen Abbau der Glucose in Zusammenhang gebracht.

5.9.3 Oszillationen der Wärmeabgabe unter Sauerstoffdruck

Bei den Versuchen zum Betriebsstoffwechsel unter Sauerstoffatmosphäre (Kap. 5.6) treten bei allen Stämmen mehr oder weniger deutliche Oszillation während des Maximums auf. Abb. 32 zeigt einige typische Beispiele (s. auch Abb. 33 u. 25).

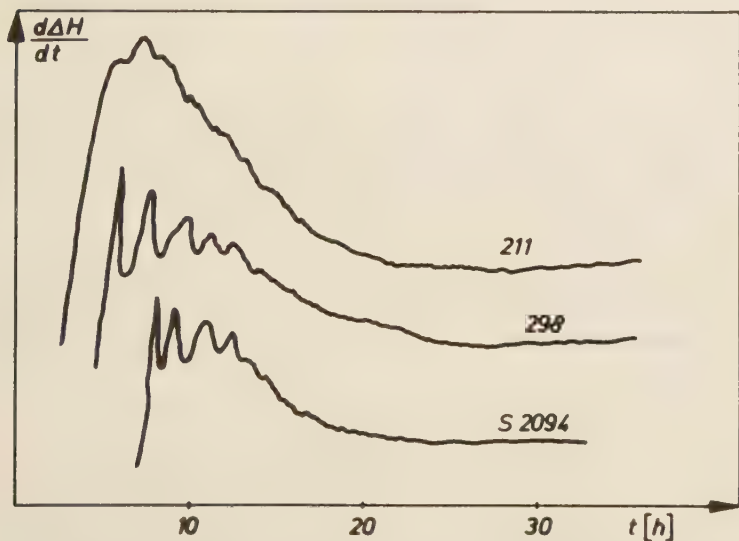


Abb. 32 Während des Betriebsstoffwechsels unter Sauerstoffdruck auftretende Oszillationen der Wärmeabgabe (Stämme 211, 298 und S 2094)

Aus den Versuchen ist qualitativ folgendes herauszustellen:

- Bei allen Stämmen kann man mindestens 5 bis 6 Oszillationen feststellen, deren Amplitude gedämpft abnimmt und deren zeitlicher Abstand zunimmt.
- Die Abnahme der Amplitude (Dämpfung) ist am größten bei den Wildstämmen 211 und 2012 (bei Stamm 211 sind die Oszillationen am wenigsten ausgeprägt) und am schwächsten bei dem extrem strahlensensiblen Stamm S 2094, während die Stämme 298 und S 2095 mit einer

Aufeinanderfolge der Höhen von 1 : 0,5 : 0,3 : 0,1 in der Mitte liegen.

- Die Abstände der Schwingungen liegen in dem Zeitbereich von 60 bis 120 Minuten, wobei die Zunahme des Abstandes zwischen zwei Schwingungen von der Glucosekonzentration abzuhängen scheint. Während die Abstände bei einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-12}$ Mol Glucose/Zelle etwa jeweils um 30 Minuten größer werden, ist bei einer Konzentration von $6 \cdot 10^{-12}$ nur eine Zunahme von 5 Minuten zu verzeichnen.

Die Oszillationen sind dem normalen Kurvenverlauf überlagert und das Ablesen der Oszillationswerte ist dadurch sehr erschwert. Da die obigen Werte außerdem nur aus je drei Meßkurven für jeden Stamm gewonnen wurden, können sie noch nicht endgültige Werte darstellen.

Die Oszillationen sind offensichtlich nicht zurückzuführen auf Undichtigkeiten der Meßkammer, da der Druck am Ende jedes Experimentes nachgeprüft wurde und in den Versuchen unter Stickstoffdruck Schwingungen nie auftreten.

Petites-Stämme zeigen keine Oszillationen.

Da die Oszillationen im Stoffwechsel von Organismen immer zurückgeführt werden können auf Regelschwingungen, sollen die Ergebnisse dieses Abschnittes in dem Kapitel 6.4 unter dem Gesichtspunkt der Enzymwirkung bei Betriebsstoffwechsel behandelt werden.

5.9.4 Auftreten eines Minimums nach dem Anfangsmaximum

Bei den Versuchen unter N_2 bzw. O_2 -Atmosphäre treten in der Hälfte der Fälle nach dem Abklingen des Maximums und vor Beginn des stationären Teils ein ganz flaches, geringes Minimum auf (s. Abb. 33).

Es wäre naheliegend, das Minimum als Zwischenbereich zu dem oft auftretenden Nebenmaximum anzusehen. Dem spricht jedoch entgegen, daß es zeitmäßig etwa doppelt so weit weg vom Hauptmaximum liegt wie das Nebenmaximum. Für eine Deutung als Minimum einer einzelnen Schwingung im Sinne

eines "overshoot" liegt es wiederum zeitlich zu spät, und gegen eine Erklärung als Übergang von Gärung zu Atmung spricht das Auftreten des Minimums auch unter N_2 -Druck.

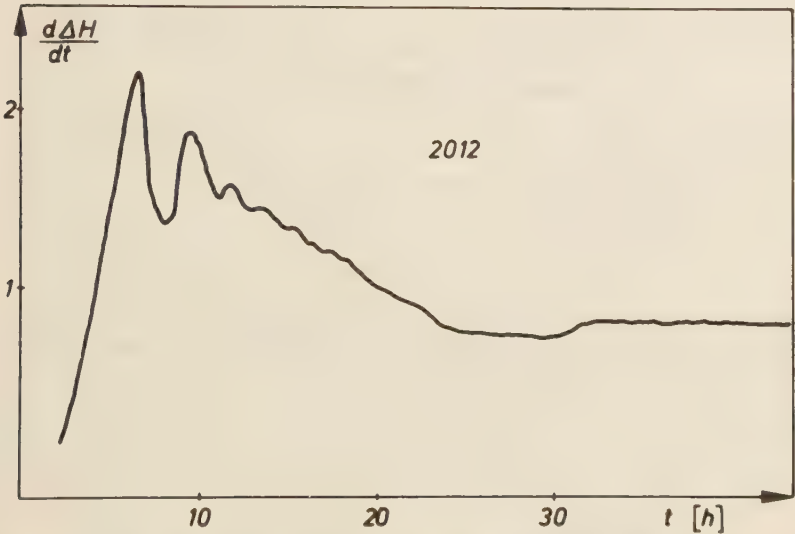


Abb. 33 Das Auftreten eines flachen Minimums nach dem Anfangsmaximum beim Betriebsstoffwechsel (Stamm 2012)

Die endgültige Deutung muß weiteren Experimenten überlassen werden.

5.10 Glucoseaufnahmeversuche mit ^{14}C -Markierung

Parallel zu den kalorimetrischen Messungen des Betriebsstoffwechsels von Zellen in Glucosepuffer wurden Aufnahmeversuche mit radioaktiv markierter Glucose durchgeführt. Die Zellen wurden in Glucosepuffer, dem ^{14}C -Glucose zugegeben war, gehalten. Vom Zeitpunkt der Inkubierung an wurde dann stündlich eine Probe entnommen und in einem Szintillationszähler ausgewertet. Es wurden die Zellen und der Überstand gemessen.

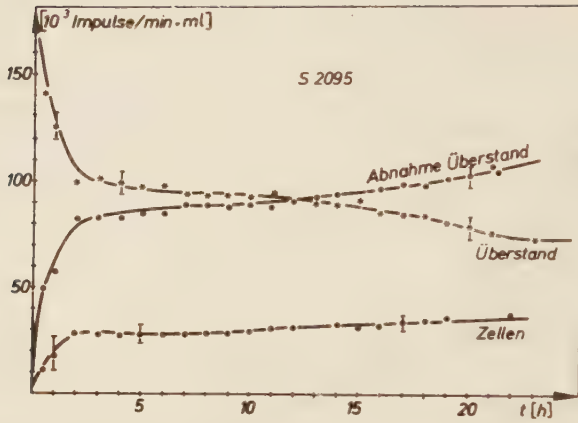


Abb. 34 Aktivität von Zellprobe und Überstand nach Inkubation in ^{14}C -markiertem Glucosepuffer (Stamm S 2095)

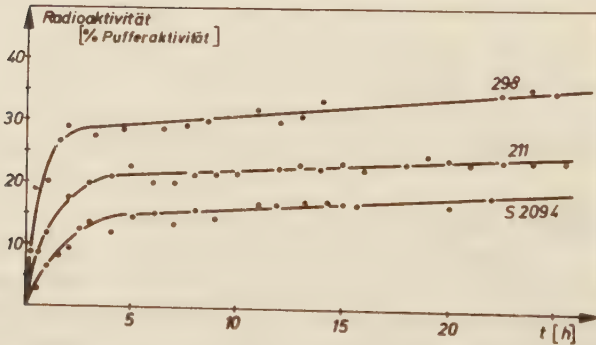


Abb. 35 Aktivitäten der Zellproben nach Inkubation in ^{14}C -markiertem Glucosepuffer bei den Stämmen 298, 211, S 2094

Man entnimmt aus den Kurven, daß nach einigen Stunden (bis 20 Stunden) der Anteil der Radioaktivität in den Zellen konstant bleibt. Diese setzt sich zusammen aus den gespeicherten ^{14}C -Atomen und den augenblicklich im Umsatz befindlichen ^{14}C -Atomen, die später wieder als Molekülbestandteile und CO_2 abgegeben werden. Aus der Konstanz der Aufnahme kann geschlossen werden, daß keine Glucose mehr gespeichert wird, sondern nur mehr ein konstanter Betriebsstoffwechsel stattfindet.

Während des Versuchsablaufes entweichen dauernd ^{14}C -Atome mit dem von den Zellen entwickelten CO_2 . Diese Atome verschwinden aus dem Puffer, werden in der Zellprobe aber nicht mitgemessen. Dadurch entsteht bei der Aktivitätsmessung eine ziemlich große Diskrepanz zwischen Zellprobe und Überstand.

Um den Anteil des augenblicklichen Umsatzpooles, den Durchfluß, zu bestimmen, wurde nach genügend langer Zeit, in der die Speicherung abgeschlossen sein sollte (24 Stunden), die Zellen aus dem radioaktiv-markierten Glucosepuffer entnommen und in frischen unmarkierten Glucosepuffer inkubiert. Von diesem Zeitpunkt ab wurde dann das Abklingen der Radioaktivität in den Zellen zeitlich verfolgt (Abb. 36).

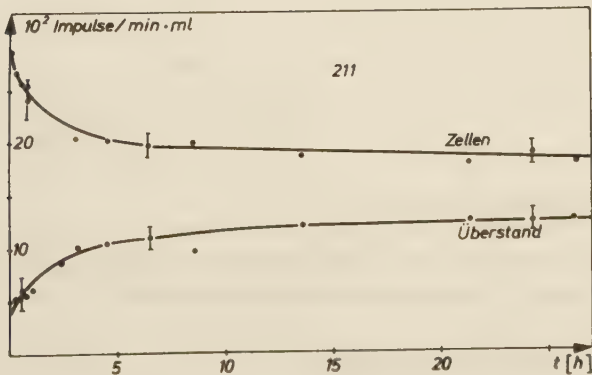


Abb. 36 Abklingen der ^{14}C -Aktivität in unmarkiertem Glucosepuffer nach vorhergehender Glucosespeicherung (Stamm 211)

Der anfängliche steile Abfall der Aktivität wird auf den Austausch derjenigen C-Atome zurückgeführt, die sich in der Zelle im Umsatz befinden, während der leicht abfallende Teil der Zellaktivität dann, über längere Zeit hinweg, dem Austausch der gespeicherten C-Atome zuzurechnen ist. Extrapoliert man den linearen Teil der Kurve auf die Zeit Null, so gibt der Schnittpunkt mit der Ordinate die Menge des insgesamt gespeicherten ^{14}C an, die Differenz zwischen diesem Wert und dem Anfangswert der Kurve den Umsatzpool. Die Aktivitätskurve des Überstandes liegt unter der der Zellaktivität. Die Erklärung liegt wiederum im Verschwinden des CO_2 aus dem System. Die Tabelle 11 gibt die nach dem eben beschriebenen Verfahren gewonnenen Werte für die gespeicherte Glucose und den Umsatzpool wieder.

Tabelle 11

DEPOTANTEIL UND AUGENBLICKLICHER UMSATZPOOL AN GLUCOSE- ^{14}C

Stamm	211	298	S 2095	S 2094	235-11c/p2	211 p5
<u>Depot</u>						
$\left[10^{-12} \frac{\text{g Glucose}}{\text{Zelle}}\right]$	7,3	5,8	7,7	1,3	1,1	0,9
<u>Umsatzpool</u>						
$\left[10^{-12} \frac{\text{g Glucose}}{\text{Zelle}}\right]$	1,4	1,5	4,3	0,9	0,4	0,3

6. Diskussion der Ergebnisse

6.1 Kurzer Abriß über die Grundmechanismen bei Dunkelreparatur, Replikation, Transkription und Rekombination

"Excision-repair"-Dunkelreparatur

Die heutigen Vorstellungen über den Ablauf der Dunkelreparatur sind schon in Kapitel 1.3.2 behandelt worden. Hier werden noch einmal die Aufeinanderfolge der Mechanismen angegeben (s. Abb. 37):

- (1) Erkennung der schadhaften Stelle, Einschnitt in der DNS mittels einer Endonuklease
- (2) Erweiterung der Lücke und Herausschneiden der Schadensstelle mittels einer Exonuklease
- (3) Neusynthetisierung einer DNS am Bruchanfang durch eine Polymerase in $5'PO_4 - 3'OH$ Richtung über etwa 10 (Setlow R.B. 1967) bis 50 Nukleotide (Howards-Flanders 1968)
- (4) Anheftung des neuen DNS-Stückes an die alte DNS durch Schließen der Lücke mittels einer Ligase.

Replikation

Die Replikation ist nach der Strukturaufklärung der DNS durch Watson und Crick (Watson 1968) ein modellmäßig einfach zu erklärender Prozeß. Eine Mutter-Helix trennt sich durch Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen in zwei Einzelstränge auf. An diesen bilden sich Komplementärstränge, die sich zu einer neuen Doppelhelix aufwickeln. Die Polymerisierung der neuen Komplementärstränge geschieht durch Anlagerung neuer Nucleotide an dem Wachstumspunkt (Replikationsbereich), wozu die Mutterstränge als Matrize benutzt werden (Knolle 1969). Wegen der Antipolarität des DNS-Doppelstranges - jeder einzelne Strang hat ein $5'PO_4$ und $3'OH$ -Ende und beide Stränge liegen zueinander antiparallel - müssen im Wachstumsbereich, bei gleichzeitiger Neusynthese auf beiden Elternsträngen, der eine Strang vom $5'$ - zum $3'$ -Ende, der andere aber vom $3'$ - zum $5'$ -Ende repliziert werden. Die bislang bekannten Polymerasen, das Kornberg-Enzym oder die Polymerase I (Kornberg 1962 und 1967, Goulian e.a. 1967) und die Polymerasen II und III (Geftter e.a. 1971) aber arbeiten nur vom $5'$ - zum $3'$ -Ende, da sie nur an das $3'OH$ -Ende Nucleotide anheften können. Die Kornberg-Polymerase wird nicht notwendig zur Replikation gebraucht (de Lucia e.a. 1969) und scheint wegen ihrer gleichzeitigen Exonukleaseaktivität ein Reparaturenzym darzustellen. Zur Erklärung der Diskrepanz liegen in letzter Zeit eine Reihe von Untersuchungen und Modellen vor, die vornehmlich auf der von Okazaki (Sakabe e.a. 1966, Okazaki e.a. 1966, 1967, 1968, 1969) aufgestellten Theorie der diskontinuierlichen DNS-Replikation beruhen. Als Beispiel sei das Modell von Haskell und Davern (1969) angeführt, nach dem man einzelne Wachstumsbereiche annimmt und den Verzweigungspunkt an der Replikations-

gabel als den Ort der Abwicklung der alten DNS und der Aufspaltung und Verknüpfung der bereits vorher replizierten, etwa 1000 Nucleotide umfassenden DNS-Stücke, zu zwei Töchter-Doppel-Helices ansieht. Der schrittweise Vorgang dieses Modells ist in Abb. 37 wiedergegeben.

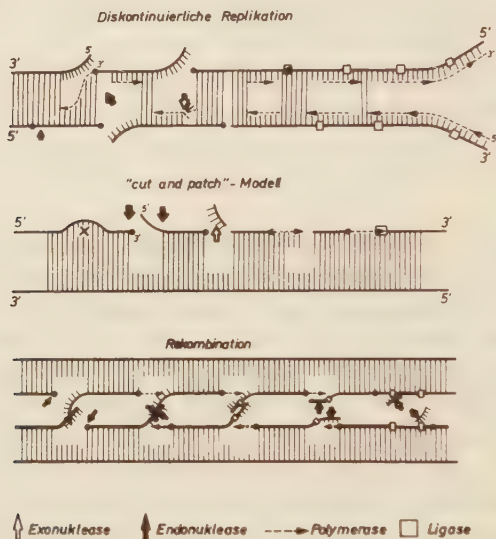


Abb. 37 Modell der gemeinsamen Grundmechanismen von Replikation, Excision-Repair und Rekombination. (Replikation nach Haskell und Davern 1969). Die Modelle sind in zeitlicher Schrittfolge von links nach rechts zu lesen.

Die Aufeinanderfolge der Schritte der Replikation ist somit:

- (1) Anbringung von Einzelstranglücken in der elterlichen DNS, die dann als Drehpunkt der Rotation der alten DNS und als Initialpunkt für die diskontinuierliche Synthese neuer DNS dienen,
- (2) welche dann vom Elternstrang abgeschnitten werden
- (3) unter Heilung der Lücken durch Neusynthese
- (4) und Wiederherstellung des intakten elterlichen Stranges.

Entsprechend dieser Reihenfolge sind nötig die Aktivität einer Endonuklease, Polymerase und Ligase.

Transskription

Transskription der genetischen Information der DNS in m-RNS ist der Startpunkt der Protein-Synthese.

Es wird heute weitgehend angenommen, daß m-RNS nur an einem der beiden elterlichen Stränge gebildet wird, wozu aber eine lokale Entspiralisierung der DNS nötig erscheint. Die Einzelschritte der Transskription könnten wie folgt ablaufen.

- (1) Es werden Einzelstranglücken angebracht, die dann als Endpunkt der Rotation der DNS wirken.
- (2) Komplementär zu einem DNS-Strang wird neue RNS synthetisiert.
- (3) Die RNS löst sich von der Mutter-DNS ab.
- (4) Die Lücken in der DNS werden wieder geschlossen.

Entsprechend dieser Schrittfolge werden folgende Enzymaktivitäten notwendig: Endonuklease, RNS-Polymerase, Exonuklease, Ligase.

Rekombination

Rekombination ist ein Prozeß, bei dem durch Vereinigung homologer Chromosomen mit Austausch von Chromatidenstücken eine Neuordnung von Genen möglich ist, so daß sich die Nachkommen in ihren Merkmalen von den Eltern unterscheiden. Rekombination gibt den Spezies die Möglichkeit zur Vererbungsvariation, welche die Basis der Evolution darstellt (neben Mutation und Selektion).

Der molekulare Vorgang ist heute noch weitgehend ungeklärt, wird aber vorwiegend nach dem "Breakage and Rejoin"-Modell (Whitehouse e.a. 1965, Patrick e.a. 1967) wie folgt dargestellt (s. Abb. 37):

- (1) Homologe DNS-Moleküle legen sich aneinander und Einzelstranglücken werden eingeführt, so daß sich komplementäre Einzelstrangbereiche assoziieren können.

- (2) An den Lücken kann inzwischen "Repair Replication" stattfinden, also eine Neusynthese der durch Assoziation gebundenen DNS.
- (3) Nach völligem Austausch der assoziierten Bereiche findet eine Degradation der DNS statt, in dem die, den neuentstandenen Abschnitt überlappende, DNS abgeschnitten wird.
- (4) Die neugeordneten Einzelstücke werden je zu einer neuen Doppelhelix verklebt.

Entsprechend dieser Einzelabschnitte müssen vier Enzymaktivitäten auftreten, nämlich eine Endonuklease, evtl. Polymerase sowie Exonuklease und Ligase.

Zusammenhänge der Grundmechanismen

Die DNS als alleiniger Träger der gesamten genetischen Information eines Organismus ist erstaunlicherweise nur an 5 biologischen bzw. biochemischen Prozessen mehr oder weniger aktiv beteiligt: Replikation, Transskription, Rekombination, Mutation, und Reparatur. Von diesen wiederum sind nur Replikation als Duplikationsmechanismus der DNS vor jeder Zellteilung und Transskription als Anfangsschritt jeder Proteinsynthese lebensnotwendig, während Rekombination, Mutation und Reparatur nur durch die nicht völlig einwandfrei ablaufenden biochemischen Prozesse möglich (Rekombination, Mutation) bzw. notwendig (Reparatur) sind, im Sinne einer Evolution mit minimaler aber optimaler Vererbungsvariation hingegen äußerst wichtig sind.

Da alle diese Prozesse an dem gleichen DNS-Molekül angreifen können, welches eine wohlgeordnete Struktur hat, ist zumindest in der Anfangsphase ihrer Einwirkung eine Übereinstimmung in ihren Mechanismen zu erwarten^{*}. Nach bislang vorliegenden Untersuchungen verlaufen alle der fünf angeführten Veränderungen in mehreren Einzelstufen, welche durch spezielle Enzyme katalysiert werden. Es ist mithin nicht verwunderlich, wenn einige dieser Schritte, in dem nach ihrer Endwirkung doch recht verschiedenen Prozesse, ähnlich, wenn nicht gar gleich, sind. Topologisch

^{*} Das wird besonders deutlich durch Anzeichen von prädestinierten Sollbruchstellen an der DNS (Mc Grath 1967).

gesehen, lassen sich an der DNS während der Einwirkung sogar die gleichen Veränderungen nachweisen (Aufnahme und Einbau spezieller organischer Moleküle, Molekulargewichtsverteilung, Absorptionsänderungen u. dgl.).

Kurze Zusammenfassungen der Verwandtschaft der oben aufgezählten molekularbiologischen Vorgänge sind bereits von Hanawalt und Haynes (1967) und Haynes e.a. (1968) publiziert worden. Einzelne Arbeiten dazu, insbesondere Zusammenhänge zwischen Rekombinations- und Excision-Reparatureigenschaften sowie zwischen Replikations- und Reparaturvermögen verschiedener Organismen, sind in den letzten Jahren zahlreich erschienen, auf das Zitieren an dieser Stelle wird verzichtet, um den Rahmen der kurzen Übersicht nicht zu sehr zu dehnen.

Schlußfolgerung für die vorliegende Arbeit

Wegen der engen Verknüpfung zwischen den obigen, lebenswichtigen Vorgängen an der DNS, auf Grund eines sehr ähnlichen Enzymsystems, sollten sich dessen Eigenschaften auch an phänotypischen Lebensäußerungen erkennen und bei Anwendung verschiedener Mutanten vergleichen lassen. Dies kann nur unter definierten Bedingungen gelingen, an deren Spitze ein weitgehend identischer, genetischer Hintergrund zu setzen ist. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme erfüllen diese Bedingung, da sie alle aus dem gleichen Stamm 211-laM (Averbeck 1970, Laskowski e.a. 1968) isoliert wurden und außer ihrem unterschiedlichen strahlensensiblen Gen weitgehend isogen und homozygot sind.

Als phänotypische Parameter zur Charakterisierung der Stämme wurden ausgewählt die Wachstumsgeschwindigkeit und der Betriebsstoffwechsel. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist ein einfach zu bestimmendes Merkmal bei mikrobiologischen Populationen und sie wird sehr stark von Replikations- und Transskriptionsmechanismen bestimmt. Der Betriebsstoffwechsel erscheint repräsentativ für den Umsatz ruhender Zellen - des üblicherweise vorliegenden Zustandes bei zu bestrahlenden Zellen - an Energie, welche einen wichtigen Faktor für den Ablauf enzymatischer Prozesse darstellt.

6.2 Wachstumsgeschwindigkeit und Strahlensensibilität

Die Wachstumsgeschwindigkeit wird bei definierten Milieubedingungen vom Genotyp einer Zelle bestimmt. Verschiedene Autoren konnten bei Hefen eine Abhängigkeit vom Ploidiegrad finden (z.B. Pohlitz e.a. 1966), Reichert (1968) stellt bei *Saccharomyces* eine definierte Abhängigkeit von der Gendosis im ad_2 -Locus fest.

Die Generationszeit ist für verschiedene strahlensensible Stämme in Kapitel 5.2 bestimmt worden. (Generationszeit t_g und Wachstumsgeschwindigkeit hängen über $t_g \cdot k = \ln 2$ zusammen). Trägt man die Werte für glucose-sättigtes Medium ($>2\%$) gegen den Dosisreduktionsfaktor auf, so erhält man mit Ausnahme der r_{3-2}^s Stämme einen hyperbolischen Zusammenhang, der sowohl für Haplonten als für Diplonten gilt (Abb. 38).

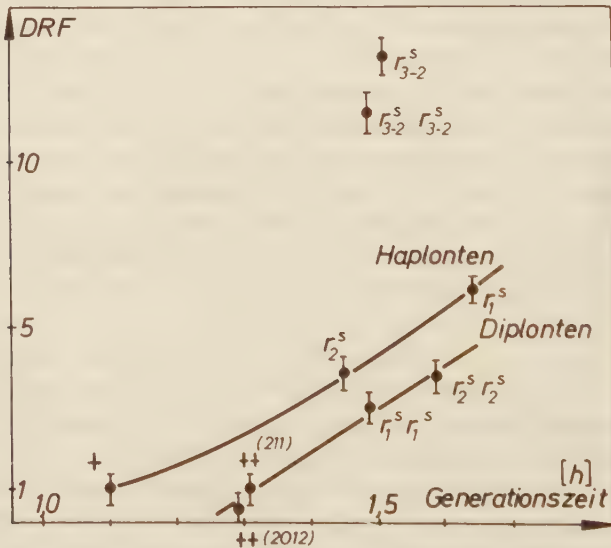


Abb. 38 Der Zusammenhang zwischen Dosisreduktionsfaktor (DRF) und Generationszeit für die haploiden und diploiden UV-sensiblen Mutanten. Erklärung der Gensymbole in Tab. 2

Die Verdoppelungszeiten der Stämme S 2094 und 2105 sind sehr viel geringer als nach ihrer Strahlensensibilität zu erwarten ist. Daraus läßt sich auf einen nur wenig gehemmten Ablauf der Replikationsschritte bei genügendem Glucoseangebot schließen. Steht keine Glucose als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, so resultiert ein deutlich langsames Wachstum für alle Stämme und die r_{3-2}^S Stämme haben die größte Generationszeit (Abb. 11). Das Abweichen dieser Stämme läßt sich wegen der sonstigen genetischen Gleichheit der strahlensensiblen Mutanten auf das Wirken einer weiteren Eigenschaft zurückführen, die ebenfalls durch das r_{3-2}^S -Gen kontrolliert wird.

Der Einfluß direkter UV-Bestrahlung auf die Wachstumsgeschwindigkeit (Kap. 5.2.2 und 5.2.3) ist nicht festzustellen. Bemerkenswert ist die hohe Resistenz der Wachstumsprozesse (Abb. 11 und 13), denn eine Dosis mit einer Abtötung auf 10^{-4} Überlebende, gemessen an der Koloniebildungsfähigkeit, wirkt auf das Wachstum nur mit einer lag-Phase von 30 Minuten Dauer (Abb. 13). An diesem Beispiel wird die Auswahl der Überlebenskriterien deutlich: die gleiche Dosis führt einmal zu 10^{-4} Überlebenden bei der Koloniebildung, zum anderen zu 80 % Überlebenden beim Wachstum. (Während der Verzögerung von 30 Minuten wäre die Population bei einer Generationszeit von 1,5 Stunden auf die 1,26-fache Anzahl gewachsen). Die geringe Empfindlichkeit des Wachstums ist auf die Resistenz der Atmungs- und Gärungsenzyme zurückzuführen (Hempel e.a. 1964), die erst bei einer Abtötung auf 10^{-5} Überlebende geschädigt werden, und auf die Fähigkeit bestrahlter Zellen, sich vor dem völligen Absterben noch bis zu sechs- und siebenmal teilen zu können. Nichtteilende Zellen können außerdem noch Stoffwechsel ausführen und in ihrem Volumen wachsen, das zu einem Anstieg der Wachstumskurven beiträgt (vgl. auch Abb. 12).

6.3 Die Energieabhängigkeit von Reparaturprozessen

Reparaturprozesse sind neben ihrer enzymatischen Natur energieabhängig, denn zu ihrem Ablauf müssen in der Zelle ATP (Adenosintriphosphat) oder, wie bei der Photoreaktivierung, Anregungsenergie zugeführt werden. Der Energiebedarf bei der Exision-Repair von UV-Schäden ist höher als der von γ -Strahlen-Schäden und für die Tätigkeit der Exonuklease größer als für die der Ligase (Papirmeister e.a. 1964, Friesen e.a. 1970,

Matsudeira 1970, Wilkins 1970). Der Energiebedarf wird durch anaeroben und aeroben Stoffwechsel gedeckt (Kiefer 1969, Matsudeira 1970), welcher durch Inhibition gezielt in einzelnen Schritten beeinflusst werden kann (Mosin 1969). Dieser Eingriff wirkt sich dann auch auf das Dunkelreparaturvermögen aus.

Die in Kap. 5.3.2 durchgeführten Reaktivierungsversuche nach UV-Bestrahlung ergeben eine eindeutige Steigerung der Reparaturrate bei Glucosezusatz zu dem reaktivierenden Medium (s. Abb. 20). Überraschenderweise zeigt sich mit steigender Glucosekonzentration dann eine weniger hohe Steigerung der Reparatur, manchmal sogar eine Behinderung. Mosin (1969a) findet ähnliche Effekte in anaeroben Milieu nach γ -Bestrahlung und gibt als Deutung eine Anreicherung von Äthanol an, welcher als Inhibitor der Glucose-Fermentation wirkt, während Wilkins (1970) bei Röntgenschäden eine Suppression einiger metabolischer Enzyme durch Glucose annimmt. Beide Erklärungen können hier sicher keine Anwendung finden, vielmehr sollten die Effekte im Zusammenhang mit dem einzelnen Reparaturgeschehen gesehen werden.

Die Aufnahme der Glucose, deren Metabolisierung und die anschließende Aktivierung der Enzymumsetzung, also die Wirkung der Energiequelle, braucht eine gewisse Zeit, so daß der Endeffekt, die Anhebung der Dunkelreparaturrate, erst nach einigen Stunden (nach Abb. 21 etwa 20 Stunden) eintritt. Erst dann sind offensichtlich alle Umsetzungen durchlaufen worden. Kürzere Inkubationszeiten ergeben nicht nur keinen Effekt, sondern erniedrigen oder hemmen die Reaktivierung proportional zu der Glucosekonzentration. Daraus läßt sich auf eine noch größere Zahl von letalen Schäden schließen, oder im Bild des "Excision-Repair" Modelles gesehen, auf eine geringere Anzahl von reparierten Schäden. Man folgert daraus eine starke Unterstützung der ersten Enzymschritte durch Glucose. Daraus ergibt sich eine große Zahl von aus der DNS herausgeschnittenen Schadensbereichen. Das führt zu einem Verzug in der Neusynthetisierung für die nachfolgenden Enzyme. Zu hohe Glucosekonzentrationen schließlich ergeben Einschnitte und Lücken in der DNS in einem die Kapazität der synthetisierenden Enzyme überschreitenden Ausmaß. Möglich sind hierbei eine Substrathemmung oder Entstehen von größeren Ausschnitten, die nicht mehr von den nachfolgenden Enzymen geheilt werden können. Die Sättigung der letzten Schritte der Reparatur kataly-

sierenden Enzyme ergibt sich aus den Maxima der Kurven der Abb. 20, während aus den auslaufenden, konstanten Teilen bei hoher Glucosekonzentration auf eine Sättigung des Umsatzes der ersteren Enzyme geschlossen werden kann.

Über das Verhalten der einzelnen Stämme läßt sich somit qualitativ sagen, daß eine Erhöhung der Reaktivierung (Dosismodifikationsfaktor) durch Glucosezusatz immer möglich ist. Die relative Steigung des Dosismodifikationsfaktors (DMF) ist abhängig von dem Faktor selbst. Unter der vereinfachenden Annahme einer logarithmischen Abhängigkeit der Zahl der Überlebenden von der Dosis - was sicher für den geraden, abfallenden Teil einer Inaktivierungskurve in erster Näherung zulässig ist - und der Annahme der Proportionalität zwischen Schäden und Überlebenden, gibt der Dosismodifikationsfaktor den Logarithmus der Zahl der reparierten Schäden, relativ zu der des Wildtypes, an. Abb. 39 zeigt die Abhängigkeit der relativen Steigerung des DMF vom DMF, die der Abhängigkeit der relativen Steigerung des DMF durch Glucosezusatz von der Zahl der reparierten Schäden ohne Glucose entspricht. Außerdem ist der hemmende Effekt bei großer Glucosekonzentration dargestellt durch die Auftragung der maximalen Hemmung der Dunkelreparatur (z.B. entnommen aus den stationären Endwerten der Abb. 21) über dem DMF. Die Übereinstimmung zwischen Steigerung und Hemmung ist wahrscheinlich zufällig, könnte aber immerhin zusammen mit der Linearität der Kurve gedeutet werden als Ausdruck verschieden vieler Enzymmoleküle (im Gesamtsystem des Reparaturvorganges) in den einzelnen sensiblen Stämmen. Dem steht allerdings entgegen, daß nicht die Enzymmenge oder deren Aktivität in einer Zelle die Sensibilität bestimmt, denn nach beliebig langer Zeit müßte auch eine geringe Aktivität zur Umsetzung aller Schäden ausreichen, sondern die Hemmung der Enzyme auf der Regulationsebene des Stoffwechsels. Eine weitergehende Deutung, ohne genauere Versuche zur Kinetik der Substrat- und Milieuabhängigkeit der Enzymkette, wäre an dieser Stelle jedoch rein spekulativ.

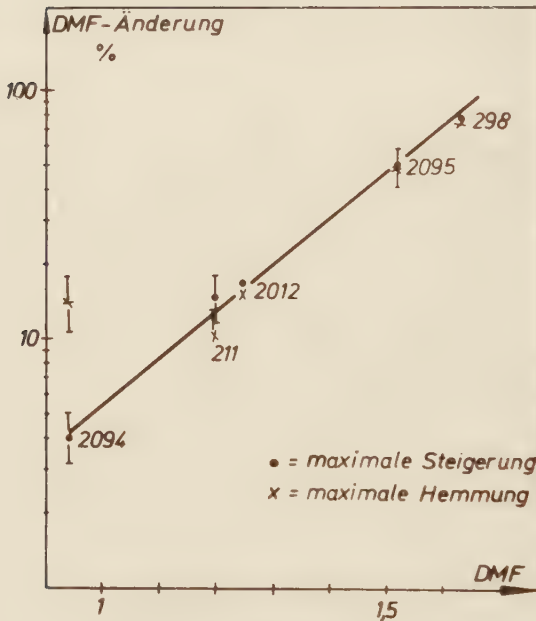


Abb. 39 Maximale Änderungen des Dosismodifikationsfaktors (DMF) (Angabe als $\Delta\text{DMF}/\text{DMF}$ bei 0 %igem Glucosezusatz) als logarithmischer Funktion des DMF bei Glucosezusatz während der Dunkelreaktivierung.

6.4 Der Betriebsstoffwechsel als charakteristisches Merkmal der Energieverhältnisse in der Zelle

Ruhende Zellen, die sich nicht vermehren, also Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase einer Kultur befinden oder in Puffer inkubiert sind, beschränken ihren Stoffwechsel aus Mangel an fermentierbaren Nährstoffen auf ein Minimum, welches gerade zum Erhalt der Überlebensfunktionen ausreicht. Die Energie für diesen Betriebsstoffwechsel nehmen sie aus intrazellulär gespeicherten Energievorräten, die in Hefezellen vor allem in Form von Glykogen (Die Hefen, S. 353, 361) angelegt sind. Stellt man ruhenden Zellen eine Energiequelle, wie Glucose zur Verfügung, so sollte man erwarten, daß diese von den Zellen aufge-

nommen wird, um ihre bis dahin schon abgebauten Reserven zu ergänzen und um ihren endogenen Stoffwechsel daraus zu bestreiten. Andere Stoffwechselprozesse, wie Wachstum oder Teilung unterbleiben wegen der fehlenden verwertbaren Stickstoffquelle. Die Untersuchungen der Kapitel 5.4 - 5.8 sowie 5.10 zum Betriebsstoffwechsel in Glucosepuffer bestätigen dies. Man findet in den Thermogrammen nach Glucosezugabe einen Anstieg der Stoffwechseltätigkeit für eine gewisse Zeit. Die diesem Maximum entsprechende Energie wird als Auffüllen von Depots erklärt (Lamprecht 1969), die während der stationären Phase der Vorkultur angegriffen wurden. Diese Annahme wird unterstützt durch die Ergebnisse, dargestellt in Abb. 23, nach denen die Depotauffüllung am größten in der lag-Phase und in der stationären Phase ist, weil während dieser Zeit die Depots erschöpft sind, während in der logarithmischen Phase, in der die größte Aktivität des Stoffumsatzes bei noch genügendem Nährangebot stattfindet, auch die Depots am besten gefüllt sind. Der Vergleich mit den Versuchen zur Aufnahme von ^{14}C -markierter Glucose (Kapitel 5.10) ergibt eine enge Parallelität. Abb. 40 zeigt die aus den Thermogrammen gewonnenen integrierten Kurven, die durch Korrektur auf den stationären Wert nur noch den Verlauf der Depotbildung angeben.

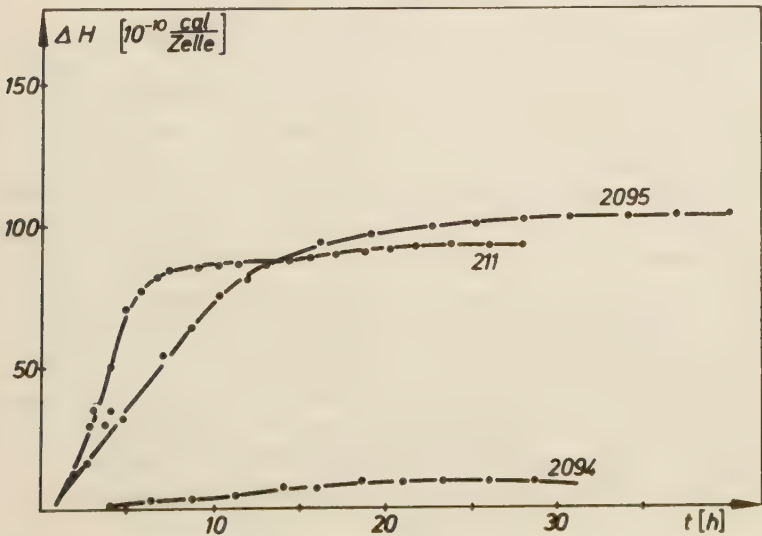


Abb. 40 Integrierte Thermogramme des Betriebsstoffwechsels nach Abzug des stationären Wärmeflusses (Stämme 211, S 2095 und S 2094).

Vergleicht man diese Kurven mit den Abb. 34 und 35, so erkennt man einen ähnlichen zeitlichen Verlauf, der durch die zeitliche Verzögerung der Kalorimeterkurven (im Kalorimeter wird nicht die Aufnahme der Glucose in die Zelle, sondern die Wärmetönung der Umwandlung der Glucose über Glucose-1-Phosphat mit Hilfe der Phosphorylase zu Glykogen gemessen) jedoch etwas verzerrt wird.

Rechnet man die in Tabelle 5 enthaltenen Werte für das Maximum mit denen in Kap. 5.5 angegebenen Umwandlungsquotienten in Glucosemenge um, unter Berücksichtigung der üblichen Annahme, daß 10 % der Kohlenstoffatome in die Zelle eingebaut werden (Lamprecht 1969, S.71, 77), so erhält man zusammen mit den in Tab. 11 enthaltenen Speicherungen folgende Werte:

Tabelle 12

VERGLEICH DER DEPOTBILDUNG ERHALTEN IM KALORIMETER
UND DURCH ^{14}C -NACHWEIS

Stamm	Speicherung $\left[10^{-12} \frac{\text{g Glucose}}{\text{Zelle}} \right]$		
	<u>Kalorimeter</u>	<u>^{14}C-Einbau</u>	<u>Verhältnis</u>
211	7,1	7,3	1,0
2012	8,4	7,2	1,2
298	7,1	5,8	1,2
2095	7,9	7,7	1,0
2094	0,7	1,3	0,6
235-11c/p2	1,5	1,1	1,4
211 p5	1,7	0,9	1,9
		Mittelwert	$1,2 \pm 0,3$

Aus den Kalorimeter- und ^{14}C -Werten entnimmt man ein Verhältnis von 1,2. Setzt man die radioaktiven Messungen als genauer voraus, bedeutet das, daß nicht jedes 10. C-Atom, sondern nur jedes 12. C-Atom (8,5 %) bei Betriebsstoffwechsel eingebaut wird. Der Wert der Speicherung der Wildtypstämme von $(7,3 \pm 0,7) \cdot 10^{-12}$ g Glucose/Zelle ist gut verträglich mit den Werten von Van Niel e.a. (1941) zu $3 \cdot 10^{-12}$ (nach Umrechnung), von Pohlitz e.a. (1966) zu $6 \cdot 10^{-12}$ und von Lamprecht (1969) zu $4 \cdot 10^{-12}$ g Glucose pro Zelle.

Atmung-Gärung

Die Verteilung des endogenen Glucoseumsatzes auf Atmung und Gärung läßt sich grob aus den Werten von Kapitel 5.6 auf 2 : 1 abschätzen, das dem Verhältnis der Energieabgabe einer Zelle bei Wachstum unter N_2 und O_2 (Lamprecht 1969, S.53, 54) entspricht. Das hier gewonnene Verhältnis von 2 : 1 sagt nichts aus über die Gesamtenergieausnutzung bei Atmung und Gärung, da sich die vorliegenden Werte nur auf die Depotbildung und Wärmeerzeugung beziehen, nicht auf die gesamte abgegebene Wärme. Außerdem wird sicher unter O_2 -Atmosphäre die Gärung nicht völlig zurückgedrängt werden.

Eine strengere Trennung zwischen Atmung und Gärung kann man einerseits aus den Versuchen mit Petites-Stämmen (Kapitel 5.7) erkennen, da diese zumindest makroskopisch erkennbar atmungsdefekt sind, andererseits aus den Versuchen mit Atmungshemmstoffen (Kapitel 5.7), da diese Stoffe die Atmungsenzyme vergiften. Unter Umständen (bei Farbstoffen) entstehen aber noch andersartige Wirkungen. Ohne auf die unterschiedlichen Werte der verschiedenen Stämme einzugehen, erhält man grob gemittelt über alle Stämme und über alle drei Größen des Betriebsstoffwechsels, zwischen Petites-Stämmen und Normalstämmen ein Verhältnis von 1 : 11, aus den Versuchen mit und ohne Hemmstoffen ein Verhältnis von 1 : 10.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die Wärmetönungen von Hefezellen bei Betriebsstoffwechsel in Glucosepuffer zum größten Teil (90 %) aus dem Atmungsstoffwechsel stammt, während die endogene Vergärung nur einen geringen Anteil (10 %) ausmacht.

Enzymatische Regelschwingungen

Bei den Versuchen zum Betriebsstoffwechsel sind die Hefezellen wegen der langen Verweilzeit in der stationären Wachstumsphase und der anschließenden, mehrstündigen Pufferinkubation ausgehungert. Sie werden deshalb bei plötzlichem Glucoseangebot (Einstoßen der Töpfchen im Kalorimeter) nicht nur Glucose aufnehmen, um sie als Glykogen zu speichern, sondern vor allem auch sofort Glucose in den anaeroben Glykolyseweg einschleusen zur Anregung des Stoffwechsels. Die Glucose wird in diesem Abbauweg über mehrere Zwischenprodukte in Alkohol und ATP umgesetzt. Die entscheidenden Enzymschritte sind hierbei die Phosphorylierung durch die Enzyme Hexokinase und Phosphofruktokinase. Dem letzteren kommt hierbei die Funktion eines Schrittmacherenzym zu, da es das hauptsächliche Regelglied in der Enzymkette ist und unter anderem sowohl durch Fructose-1,6-diphosphat und AMP aktiviert als durch ATP (Endprodukt) gehemmt werden kann.

Werden nun Hefezellen im stationären "Ruhezustand" des Betriebsstoffwechsels durch Glucosezugabe in einen neuen Zustand mit höherem Glucoseumsatz versetzt, so ist nach der Theorie der Regelung zunächst eine Übergangsphase von dem alten in das neue stationäre Fließgleichgewicht zu erwarten.

Kopperschläger (1964, 1968) fand, daß unter aeroben und anaeroben Bedingungen die Geschwindigkeit des Glucoseverbrauchs bei Hefezellen (Bäckerhefe) in den ersten drei Minuten nach Inkubation von einem hohen Maximum auf ein Minimum abfällt und sich etwa nach fünf Minuten auf einen stationären Endwert einstellt, wobei das Verhältnis von Anfangswert zu Endwert etwa 2,6 beträgt. Rechnet man seinen Anfangswert von $840 \text{ } \mu\text{Mol Glucose/h.ml-Zellen}$ unter der Annahme eines Trockengewichtes von $2,9 \cdot 10^{-12} \text{ g}$ für eine tetraploide Hefezelle um, so erhält man einen Glucoseumsatz von $9,7 \cdot 10^{-14} \text{ Mol/h.Zelle}$, welcher einem Kalorimeterwert ($Q = 26,8 \text{ kcal/Mol Glucose}$) von $2,6 \cdot 10^{-9} \text{ cal/h.Zelle}$ entsprechen würde.

Durch gleichzeitiges Messen des Hexokinase- und Phosphofruktokinasegehaltes und des ATP/AMP-Spiegels konnte er den dreiphasigen Verlauf des Glucoseumsatzes auf die Regelung der Phosphofruktokinase zurückführen.

Die in Kapitel 5.9 beschriebenen schnellen Enthalpieänderungen im Kalorimeter kurz nach Glucosezugabe (Einstoßpeak) liegen etwa in dem selben Zeitbereich, wenn man die Verzögerung des Signals durch die Trägheit der Anzeige berücksichtigt. Die durchschnittliche Enthalpieänderung des Einstoßpeaks von $2,5 \cdot 10^{-9}$ cal/h.Zelle ergibt zusammen mit dem Mittelwert des stationären Endwertes des Betriebsstoffwechsels von $1 \cdot 10^{-9}$ cal/h.Zelle ein Verhältnis von 2,5. Alle drei Werte korrelieren gut mit dem o.a. Modell der Enzymregelung.

Die unter O_2 -Druck auftretenden Oszillationen der Wärmetönung (Kap.5.9) deuten auf einen oszillierenden Metabolismus in den Zellen hin als Ausdruck seiner rückgekoppelten Struktur. Periodische Änderungen sind bislang hauptsächlich bei der Glykolyse in gärenden Hefen festgestellt worden (Hess 1969, Pye 1969), Untersuchungen an intakten Zellen nur vereinzelt (Pye 1969, Jacob 1969) unter Benutzung spektroskopischer und manometrischer Methoden durchgeführt worden. Unter aeroben Verhältnissen finden manche Autoren (Mühlig 1969, Gottschalk 1971) Stoffwechselrhythmen mit einer Periodenlänge von 20 bis 60 sec. Die im Kalorimeter beobachteten Perioden liegen jedoch zwischen 60 und 120 Minuten, also im Bereich der Generationszeit, welche im allgemeinen zwar wesentlich in die Synthesegeschwindigkeit eines Enzyms eingeht, in dem hier vorliegenden Fall ruhender Zellen aber kaum eine Rolle spielen sollte.

Da eine genaue Analyse der Oszillationen auch in Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck, sowie intrazellulärer Poolmessungen nicht vorliegen, läßt sich nur schließen, daß die Oszillationen unter Umständen auf die Atmungsstätigkeit im Zitratzyklus zurückzuführen sind (atmungsdefekte Stämme und atmungsvergiftete Zellen zeigen keine Oszillationen), in der dann die Citratsynthetase als Regelglied durch die Wirkung von ATP beeinflusst wird. Allerdings ist auch eine Rückkopplung auf den Glykolyseweg nicht auszuschließen (Pasteur-Effekt). Die Periodenlänge von 60 - 120 Minuten legt jedoch in dem vorliegenden Fall eine Deutung von Diffusionsvorgängen in dem gegebenen System nahe. Bei den geometrischen Dimensionen der Kalorimeterkammer, einem Druck von 2 at Sauerstoff und einem Diffusionskoeffizienten von $1,2 \cdot 10^3$ cm²/min für Sauerstoff liegen die oben angegebenen Frequenzen in der Größenordnung von möglichen periodischen Schwingungen in der Nachdiffusion von Sauerstoff.

6.5 Betriebsstoffwechsel und Strahlensensibilität

Nachdem in Abschnitt 6.4 die kalorimetrischen Größen des Betriebsstoffwechsels als die den Energieumsatz anzeigenden Parameter gekenn zeichnet worden sind, liegt es nahe, wegen der deutlichen Energieabhängigkeit der Dunkelreparaturprozesse (siehe Kapitel 6.3), den Betriebsstoffwechsel als Grundlage des Reparaturvermögens eines Stammes zu untersuchen. Es scheint einsichtig, daß die Fähigkeit, Glucose zu speichern und im endogenen Stoffwechsel umzusetzen, gleichlaufend zur Strahlenresistenz und zum Reparaturvermögen gehen sollte.

In Abb. 41 ist der Dosisreduktionsfaktor (DRF) über dem maximalen Wärme flu ß aufgetragen. Man erkennt, daß die Strahlenempfindlichkeit (DRF) mit der Fähigkeit zur Glucosespeicherung also mit dem Energievorrat abnimmt.

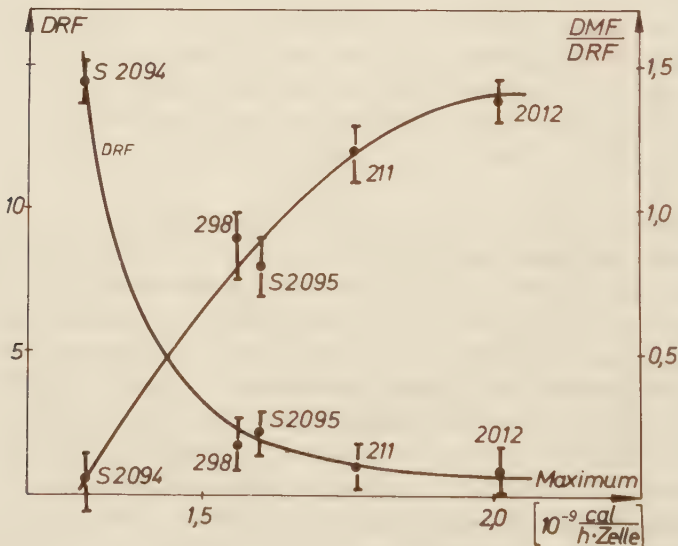


Abb. 41 Der Zusammenhang zwischen Dosisreduktionsfaktor (DRF) bzw. des Verhältnisses aus Dosismodifikationsfaktor (DMF) und DRF und der maximalen Wärmeabgabe bei Betriebsstoffwechsel.

Wie im Kapitel 1.3.3 ausgeführt wurde, ist die Strahlenempfindlichkeit bei sonst isogenen Mutanten und definierten äußeren Bedingungen nur auf verschiedene Hemmung der Reparaturprozesse zurückzuführen. Die Wirkung dieser Mechanismen kommt einmal in dem Dosisreduktionsfaktor zum Ausdruck, der die sofortige Effektivität der Enzymtätigkeit angibt, zum anderen aber im Dosismodifikationsfaktor, der die längerfristige Wirkung der Enzyme während der Dunkelpause wiedergibt. Die gesamte Aktivität der Enzyme kommt dann im Verhältnis der letalen Dosen der Mutante nach Reparatur zu der des Wildstammes ohne Reparatur zur Geltung, also im Verhältnis DMF : DRF (siehe Kapitel 5.3)

$$\frac{\text{DMF}}{\text{DRF}} = \frac{\text{LD (+ Reaktivierung der Mutante)}}{\text{LD(des Wildtypes)}}$$

Die Auftragung dieses Wertes über dem maximalen Wärmefluß (Abb. 41) zeigt einen Anstieg mit dem Maximum, woraus (wiederum) zu schließen ist, daß die Fähigkeit, Schäden in der Zelle zu manifestieren bzw. zu reparieren, stark abhängig ist von der Fähigkeit der Zelle zur Energiespeicherung.

Durch exponentielle Auftragung des Modifikationsfaktors, bzw. logarithmische Einteilung der anderen Achse, bekommt man eine Aussage über die Zahl der insgesamt reparierten Schäden (siehe Kapitel 6.3), relativ zu denen des Wildtypes. Abb. 42 zeigt das Verhältnis der Modifikationsfaktoren in Abhängigkeit vom maximalen Wärmefluß.

Man findet für die Diplonten eine Gerade der Form

$$\frac{\text{DMF}}{\text{DRF}} = 7,0 \cdot 10^{\log(\dot{\Delta H}_{\text{max}})} - 0,64$$

mit der Standardabweichung $s = \pm 0,15$ und dem Korrelationskoeffizienten $r = 0,97$. Für die Haplonten folgt eine Gerade

$$\frac{\text{DMF}}{\text{DRF}} = 4,6 \cdot 10^{\log(\dot{\Delta H}_{\text{max}})} + 1,2$$

mit $s = \pm 0,12$ und $r = 0,98$. Es ergibt sich also eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zahl der reparierten Schäden und der Energiespeicherung.

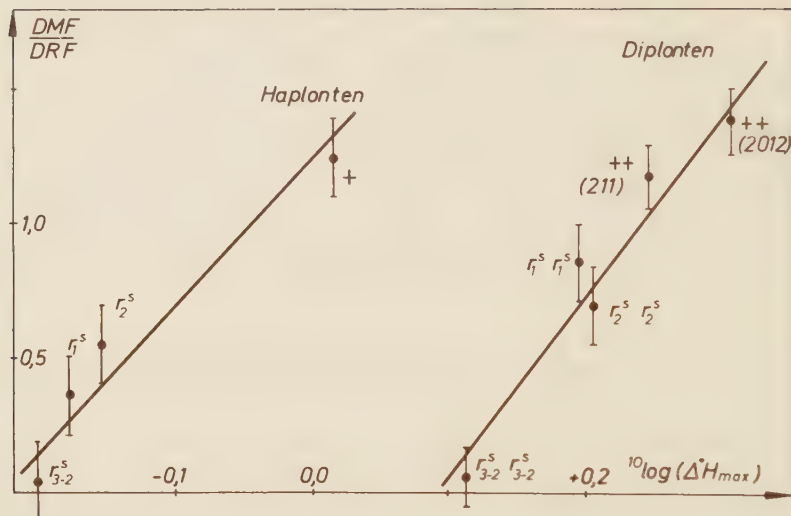


Abb. 42 Das Verhältnis Dosismodifikationsfaktor zu Dosisreduktionsfaktor DMF/DRF aufgetragen über dem Logarithmus des maximalen Wärmefflusses beim Betriebsstoffwechsel der Haplonten u. Diplonten.

Unterscheidet man zwischen den Schäden, die sofort nach der Bestrahlung geheilt werden, die also den Dosisreduktionsfaktor bestimmen, und den Schäden, die erst später während der Dunkelreaktivierung repariert werden, die also den Dosismodifikationsfaktor bestimmen, so sollte die Zahl der letzteren (also der DMF) wesentlich von der Fähigkeit der Zelle abhängen, die vorher gespeicherte Energie in den Stoffwechsel einzuschleusen. Je höher dieser Umsatz ist - im Kalorimeter gemessen als stationäre Wärmeerzeugung $\dot{\Delta H}_{\text{stat}}$ - um so effektiver sollte das Reparaturgeschehen ablaufen können.

Eine derartige Auftragung (Abb. 43) ergibt eine lineare Abhängigkeit

$$\text{DMF} = 2,4 \cdot 10^{\log (\dot{\Delta H}_{\text{stat}})} + 1,3$$

mit der Standardabweichung $s = \pm 0,1$ und dem Korrelationskoeffizienten

$r = 0,95$ für Diplonten. Für Haplonten erhält man

$$\text{DMF} = 1,4 \cdot 10 \log (\Delta \dot{H}_{\text{stat}}) + 2,0$$

mit $s = 0,04$ und $r = 0,98$.

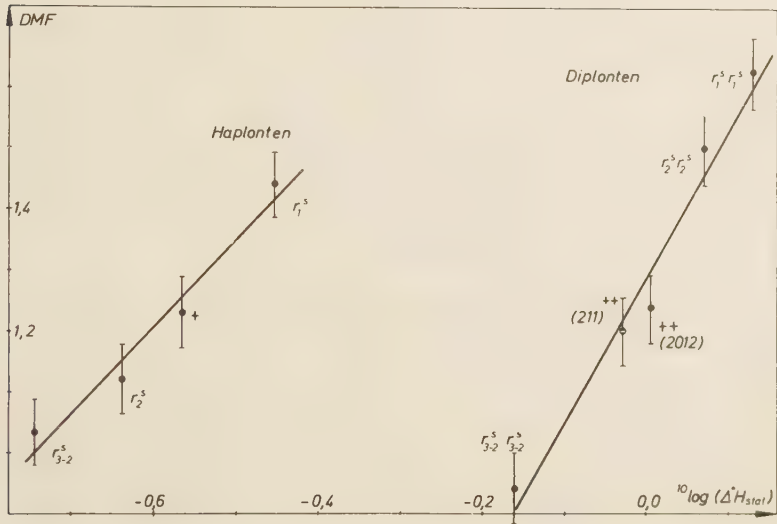


Abb. 43 Zusammenhang zwischen Dunkelreparaturvermögen (DMF) und stationärem Wärmefluß des Betriebsstoffwechsels.

6.6 Abschätzung des Energiebedarfs bei Reparaturprozessen

Mindestbedarf

Die durch UV-Bestrahlung erzeugten Schäden manifestieren sich größtenteils als Thymindimere ($\hat{T}T$) in der DNS (Kapitel 1.3.1). Nimmt man an, daß ein $\hat{T}T$ durch ein UV-Quant der Energie $E = h \cdot \nu$ erzeugt wird, so ist zur Umkehrung der Reaktion mindestens die gleiche Energie erforderlich.

übernimmt man den LD_{37} Wert für eine "supersensitive" Hefemutante zu $0,3 \text{ erg/mm}^2$ (Khan e.a. 1970), die kaum Reparatur von Schäden ausführen kann, so gibt der Wert bei einer einfachen experimentellen Trefferkurve die Dosis für einen letalen Treffer/Zelle an.

Ergibt jedes $\uparrow\uparrow$ einen letalen Treffer, erhält man für den Wildtyp 211 mit einer LD_{37} von 2300 erg/mm^2 etwa 7700 Thymindimere, die offensichtlich zu 63 % repariert worden sind. Dazu sind bei einfacher Umkehrung des Entstehungsprozesses 4800 UV-Quanten der Wellenlänge 253,7 nm, insgesamt $9 \cdot 10^{-16} \text{ cal}$ pro Zelle notwendig, welche für die einzelne Zelle mit einem Energievorrat von rund $10^{-12} \text{ g Glucose}$ (siehe Tabelle 12) ohne weiteres aufzubringen ist. Denn im ungünstigeren Falle der Vergärung ist für die Zelle noch eine freie Enthalpie von $\Delta G = 56 \text{ kcal/Mol Glucose}$ unter den physiologischen Bedingungen in der Zelle (40 % Ausnutzung), also 10^{-10} cal verfügbar.

Bei einer maximalen Zellzahl von 10^{10} Zellen im Kalorimetergefäß müßten zur Reparatur $9 \cdot 10^{-6} \text{ cal}$ umgesetzt werden, die bei einem Umwandlungsquotienten von $Q = 26,8 \text{ (kcal/Mol Glucose)}$ im Kalorimeter unter den eben genannten Bedingungen eine Wärmetönung von 10^{-5} cal in etwa 40 Stunden ergäben. Bei einer maximalen Empfindlichkeitsanzeige des Kalorimeters von $3 \mu\text{W}$ (Kapitel 3.1) bzw. $2,6 \cdot 10^{-3} \text{ cal/h}$ ist dieser Prozeß nicht zu erfassen.

Abschätzung aus dem Betriebsstoffwechsel bestrahlter Zellen

Da die Reparaturprozesse nicht nach einer einfachen Rückreaktion erfolgen, sondern nach einem komplizierten Mechanismus in einer Enzymkette verlaufen (Kapitel 1.3.2), bei der vielfältige Umsetzungen und Neusynthese von Molekülbereichen stattfinden, wird der Verlauf des Reparaturgeschehens auch mit einem höheren Energieumsatz und einer höheren Wärmetönung stattfinden. Im Kapitel 5.8 sind nach Bestrahlung von Zellen im Kalorimeter leicht erhöhte Wärmetönungen beschrieben worden. Auf Grund dieser Messungen ist folgende Abschätzung für den Wildstamm möglich.

Zu einer Inaktivierung auf 20 % Überlebende nach Dunkelreparatur mit Glucosezusatz, ist eine Dosis von 3300 erg/mm^2 notwendig, welche nach

obiger Rechnung, durch Bezug auf einen supersensitiven Stamm, einer Zahl von 11000 Dimeren entspricht. Für die Population treten aber nur 80 % abgetötete Zellen auf, also 1,6 Dimere pro Zelle, so daß im Wesentlichen 11000 Schäden repariert worden sein müssen*. Die Wärmetönung ist in diesem Fall (Kapitel 5.8) zu $12 \cdot 10^{-11}$ cal/Zelle gemessen worden, woraus eine Enthalpieänderung von $\Delta H = 1,1 \cdot 10^{-14}$ cal/reparierten Schäden resultiert. Für die anderen Versuche ergeben sich die Werte der Tabelle 13.

Tabelle 13

WÄRMEABGABE BEI REPARATURPROZESSEN

Stamm	$\Delta H \left[10^{-14} \text{ cal/Schaden} \right]$
211	1,1
2012	0,9
298	3,7 Mittelwert 2,2
2095	2,8
2094	2,5

Bei einem Wirkungsgrad der Zelle von 40 % erhält man einen Energiebedarf von

$$E = 3,7 \cdot 10^{-14} \text{ cal} = 9,3 \cdot 10^5 \text{ eV}$$

zur Beseitigung eines letalen Schadens.

* Bei einer die experimentellen Kurven besser beschreibenden "Multi-Target-Gleichung"

$$N/N_0 = 1 - (1 - e^{-kD})^n$$

(k = Inaktivierungsfaktor, D = Dosis, n = Anzahl der notwendig zu treffenden Bereiche in der Zelle) - n erhält man durch Extrapolation des geraden Teils der Kurve auf die Dosis Null zu $n \approx 20$ - ergäbe eine Dosis von 80 % Abtötung zwar 3,7 Dimere pro Target, was aber an der Gesamtzahl der zu reparierenden Schäden nur verschwindend wenig ändert.

Abschätzung aus dem Energiebedarf bei Wachstum

Wegen der Ähnlichkeit der Reparaturmechanismen mit dem Replikationsablauf (Kapitel 6.1) ist eine Abschätzung über die abgegebene Wärme pro Zelle bei Wachstum in Vollmedium möglich.

Beim Wachstum erhält man im Kalorimeter eine Wärmeabgabe von $1,9 \cdot 10^{-8}$ cal/Zelle. (Lamprecht 1969, S.50). Bei einem Trockengewicht einer Hefezelle von $1,44 \cdot 10^{-11}$ g entspricht das mit dem DNS-Gehalt von $4,5 \cdot 10^{-14}$ g/Zelle (Laskowski 1960, Laskowski e.a. 1960a,b) einer Wärmeabgabe von $5,9 \cdot 10^{-11}$ cal pro gebildeter DNS in der Zelle. Auf Grund der Theorie der diskontinuierlichen Replikation (Kapitel 6.1) der DNS treten an einem DNS-Molekül mehrere Wachstumsbereiche im Abstand von ca. 1000 Nucleotiden auf. Damit gibt es für jedes DNS-Molekül mit einer Länge von ca. 10^6 Nucleotiden etwa 10^3 Replikationsbereiche. Das führt beim Wachstum zu einer Wärmeabgabe von $5,9 \cdot 10^{-14}$ cal/Replikationsbereich. Nimmt man an, daß die Enzymtätigkeit an einem Replikationsbereich mindestens der bei der Reparatur von Schäden entspricht, so entspricht der letzte Wert größenordnungsmäßig den oben abgeschätzten von $2,2 \cdot 10^{-14}$ cal.

Da für einfache atomare Prozesse, wie Anregung, Bindung und Ionisation, Energiebeträge der Größenordnung 1 - 10 eV pro Atom umgesetzt werden, sind mithin zur Beseitigung eines letalen Strahlenschadens etwa 10^5 Elementarprozesse erforderlich. Dieser Aufwand ist gegenüber der Entstehung des Schadens durch nur einen Elementarprozeß gewaltig hoch, angesichts der vielfältigen Funktion des reparierenden Enzymsystems, nämlich optimale Wirkung bei allen Mechanismen an der DNS, erscheint der Wert jedoch verständlich.

7. Zusammenfassung

An einer Reihe von verschiedenen, strahlensensiblen aber sonst isogenen und homozygoten Mutanten von *Saccharomyces* kann eine starke Abhängigkeit der Strahlensensibilität gegenüber UV-Bestrahlung vom Energiehaushalt der Zelle festgestellt werden.

- Um Korrelationen zwischen Strahlensensibilität und Energieumsatz in der Zelle zu finden, wurde zunächst in einem Mikrokalorimeter der Betriebsstoffwechsel von Hefezellen untersucht. An ruhenden Zellen werden mikrokalorimetrische Thermogramme des Betriebsstoffwechsels gewonnen (Kapitel 5.4 und 5.5.), welche zusammen mit Untersuchungen des Betriebsstoffwechsels unter Stickstoff- und Sauerstoffatmosphäre (Kapitel 5.6), unter Zugabe von Atmungsinhibitoren sowie an atmungsdefekten Stämmen (Kapitel 5.7) als charakteristisches Merkmal der Energielage der Zelle gedeutet werden. Ein starkes Anfangsmaximum nach Glucosezugabe (Abb. 22) kann zusammen mit Aufnahmeversuchen von ^{14}C -markierter Glucose (Kapitel 5.10) mit dem Auffüllen eines intrazellulären Depots erklärt werden, während der nachfolgende, konstante Verlauf der Wärmeabgabe die Umsatzrate des endogenen Stoffwechsels darstellt. Beide Größen sind von dem betreffenden strahlensensiblen Gen abhängig und ergeben einen annähernd linearen Zusammenhang zu der Zahl der reparierten Schäden (Abb. 42 und 43). In orientierenden Versuchen wird für entsprechende, strahlensensible Haploten ein ähnliches Verhalten gefunden.
- In den Thermogrammen auftretende Feinstrukturen werden unter anderem enzymatischen Regelmechanismen der Atmung und Gärung zugesprochen (Kapitel 5.9 und 5.8.5).
- Der Zusammenhang zwischen Strahlensensibilität und Energiereserven in der Zelle wurde in Bestrahlungsversuchen nachgeprüft. Dunkelreaktivierungsversuche mit Glucosezugabe zeigen bei allen Mutanten eine Steigerung der Überlebensrate, die mit zunehmender Glucosekonzentration jedoch wieder abnimmt und unter den Vergleichswert sinkt (Abb. 20). Dieses Verhalten wird an Hand des "Excision-Repair"-Modells diskutiert (Kapitel 6.3).

- Zur experimentellen Ausführung wurden einige Zusatzeinrichtungen am Mikrokalorimeter konstruiert. Insbesondere wurden eine Lichtleiteranordnung zur Messung der optischen Trübung und eine weitere zur UV- Bestrahlung im Kalorimeter entwickelt (Kapitel 5.1.2 bis 5.1.4).
- Messungen der Wachstumsgeschwindigkeit ergeben steigende Generationszeiten mit zunehmender Strahlensensibilität. Die Zuordnung ist nicht streng, da Ausnahmen möglich sind (Kapitel 6.2).
- Aus der nach Bestrahlung auftretenden zusätzlichen Wärmetönung wird der Energiebedarf zur Beseitigung eines Schadens auf $3,7 \cdot 10^{-14}$ cal = ca. 10^6 eV abgeschätzt. Dieser Wert stimmt größenordnungsmäßig überein mit einer Abschätzung, die man aus Wärmetönungen beim Wachstum von Zellen erhält (Kapitel 6.6).

Die gewonnenen Ergebnisse werden erörtert im Rahmen der Ähnlichkeit der molekularen Mechanismen von Reparatur, Replikation, Transskription, Mutation und Rekombination.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Alper T., Gillies N.E. (1958) Restoration of E.coli strain B after irradiation: Its dependence on suboptimal growth conditions
J.gen.Microbiol 18, 461-472
- Alper T., Gillies N.E. (1960) The relationship between growth and survival after irradiation of E.coli B and 2 resistant mutants
J.gen.Microbiol.22, 113-128
- Averbeck D. (1970) Isolierung und Charakterisierung von drei UV-sensiblen Saccharomyces-Mutanten
Dissertation, Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin
- Averbeck D., Laskowski W., Eckardt F., Lehmann-Brauns E. (1970) Four radiation sensitive mutants of Saccharomyces
Molec.Gen.Genetics 107, 117-127
- Beukers R., Berends W. (1960) Isolation and identification of the irradiation product of thymine
Biochem.Biophys.Acta 41, 550-551
- Boyce R.P., P.Howard-Flanders (1964) Release of ultraviolet light induced dimers from DNA in E.coli K12
Proc.Nat.Acad.Sci. 51, 293-300
- Boyle J.M., Patterson M.C., Setlow R.B. (1970) Excision-repair properties of an E.coli mutant deficient in DNA polymerase
Nature 226, 708-710
- Boivinnet P. (1971) Contributions de la Calorimetrie aux recherches biologiques actuelles
Proc. 1.Europ.Biophys.Congress
Vol.IV, 277-284, Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, Wien 1971
- Bridges B.A., Munson R.J.(1968) The persistence through several replication cycles of mutation-producing pyrimidine dimers in a strain of Escherichia coli deficient in excision repair
Biochem.Biophys.Res. Commun. 30, 620-624
- Calvet E., Prat H. (1956) Microcalorimetrie-applications physicochimiques et biologiques
Paris 1956

- Calvet E., (1962) In: Experimental Thermochemistry
Vol. II, New York
- Čechařek Z., J.Hillova (1970) DNA synthesis and changes in radiosensitivity during the cell cycle of vegetative culture of *Chlamydomonas reinhardtii*
Int.J.Radiat.Biol. 17, 127-134
- Cleaver J.E. (1970) DNA repair and radiation sensitivity in human (*Xeroderma pigmentosum*) cells
Int.J.Radiat.Biol. 18, 557-565
- Cook J.S., Mc Grath J.R.(1967) Photoreactivating-enzyme activity in metazoa
Proc.Nat.Acad.Sci. 58, 1353-1365
- Cox B.S., Parry J.M. (1968) The isolation, genetics and survival characteristics of UV light-sensitive mutants in yeast; *Mutat.Res.* 6, 37-55
- Crossfill M.L., Lindorp P.J., Rotblat J. (1959) Variation of sensitivity to ionizing radiation with age
Nature 183, 1729-1730
- Doudney C.O. (1971) Increased resistance of DNA replication to UV light damage in amino acid-starved bacteria
Biochim.Biophys.Acta 228, 57-66
- Fox M., Hopkins J. (1970) Post-irradiation DNA degradation and response to fractionated doses in *Micrococcus radiodurans*
Int.J.Radiat.Biol. 18, 507-519
- Friesen B.S., Iyer P.S., Baptist J.E., Meyn R., Rodgers J.-M. (1970) Glucose-induced resistance to γ -rays in *E.coli*
Int.J.Radiat.Biol. 18, 159-172
- Game J.C., Cox B.S. (1971) Allelism tests of mutants affecting sensitivity to radiation in yeast and a proposed nomenclature
Mutat.Res. 12, 328-331
- Geftter M.L., Becker A., Hurwitz J. (1967) The enzymatic repair of DNA: I. Formation of circular DNA
Proc.Nat.Acad.Sci. 58, 240-255
- Geftter M.L., Hirota Y., Kornberg T., Wechsler J.A., Barnoux C. (1971) Analysis of DNA polymerase II and III in mutants of *E.coli* thermosensitive for DNA synthesis
Proc.Nat.Acad.Sci. 68, 3150-3153

- Gottschalk H.J. (1971) Stoffwechselrhythmen bei aeroben Hefen
Arch.Mikrobiol. 79, 249-262
- Goulian M., Kornberg A.,
Sinsheimer R.L. (1967) Enzymatic synthesis of DNA: XXIV Synthesis of infectious phage ØX 174 DNA
Proc.Nat.Acad.Sci. 58, 2321-2328
- Grossmann L., Kushner S.,
Kaplan J., Mahler F. (1970) Enzymatic repair of UV damaged DNA
Biophys.Soc.Abstr., 14.Meeting 1970, Nr. WPM-C2
- Hanawalt P.C., Haynes R.H. (1967) Reparatur schadhafter DNS
Umschau 17, 553-559
- Harm W., Harm H., Rupert C.S.
(1970) Analysis of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by single light flashes
Mutat.Res. 10, 277-333
- Haskell E.H., Davern C.J. (1969) Pre-Fork synthesis: A model for DNA replication
Proc.Nat.Acad.Sci. 64, 1065-1070
- Haynes R.H. (1964) In: Augenstein, L.R.Mason, B.Rosenberg (Ed.) Physical Processes in Radiation Biology, p.51-72
Acad.Press, New York, London 1964
- Haynes R.H., Baker R.M.,
Jones G.E. (1968) Genetics implications of DNA repair
In: G.O.Phillips, Energetics and Mechanism in Radiation Biology, 425-465
Acad.Press, London 1968
- Die Hefen (1960) Band I, Die Hefen in der Wissenschaft
Nürnberg 1960, Hans Carl Verlag
- Hempel S., Laskowski W. (1964) Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades: VII. Vergleichende Untersuchung Strahlen- und Bernsteinsäureperoxyinduzierter Atmungs-, Gärungs- und Knospungshemmung
Z.Naturforsch. 19 b, 929-935
- Hess B. (1969) Die Glykolyse in Experiment und Modell
stud.biophys. 14, 119-120
- Hill R.F. (1958) A radiation sensitive mutant of E.coli
Biochim.Biophys.Acta 30, 636-637

- Howard-Flanders P. (1968) DNA repair
Ann.Rev.Biochem. 37, 175-200
- Jacob H.E., Kretschmer S. (1969) Oszillationen des Redoxpotentials einer Bacillus subtilis Kultur
stud.biophys. 14, 151-156
- Jagger J., Stafford R.S. (1962) Biological and physical ranges of photoprotection from UV damage in microorganism
Photochem.Photobiol. 1, 245-257
- Jagger J., Stafford R.S. (1965) Evidence for two mechanism of photo-reactivation in E.coli B
Biophys.J. 5, 75-88
- Jagger J., Stafford R.S.,
Snow J.M. (1969) Thymin dimer and action-spectrum evidence for indirect photoreactivation in E.coli
Photochem.Photobiol. 10, 383-395
- Khan N.A., Brendel M.,
Haynes R.H. (1970) Supersensitive double mutants in yeast
Molec.Gen.Genetics 102, 376-378
- Kiefer J. (1969) B-raysplit-dose recovery in diploid yeast in hypoxic conditions
Nature 223, 405-406
- Knolle P. (1969) DNS-Synthese in kleinen Schritten?
Naturw.Rundschau 22, 166-167
- Kössler F. (1970) Ursachen der verschiedenen Strahlenempfindlichkeit und modifizierende Faktoren
Biol.Rundschau 8, 331-345
- Kopperschläger G., Hoffmann E.
(1964) Zur Kinetik des aeroben und anaeroben Glucoseschwundes in Hefezellen
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chemie 339, 90-103
- Kopperschläger G. (1968) Über die Begrenzung des aeroben und anaeroben Glucoseverbrauches in Hefezellen durch Enzyme der Gärungskette
Wiss.Z.Karl Marx Universität Leipzig 17, 1968, Math.-Naturwiss.Reihe, Heft 4, 623-629
- Kornberg A. (1962) Enzymatic synthesis of DNA, in: CIBA Lectures in microbial biochemistry, Wiley, New York 1962

- Kornberg A. (1967) The synthesis of DNA
Science 158, 1548-1550
und: In vitro synthesis of DNA: A perspective on research
Science 158, 1550-1551
- Lamprecht I. (1969) Mikrokolorimetrische Untersuchungen an Hefekulturen
Dissertation der Math.-Nat.Fak. der Freien Universität Berlin 1969
- Lamprecht I., Meggers C.(1969a) Mikrokolorimetrische Untersuchungen zum Einfluß des Rührens auf das Wachstum von Hefen
Z.Naturforsch. 24 b, 1205-1207
- Lamprecht I., Meggers C.,
Stein W. (1971) Mikrokolorimetrische Untersuchungen zum Stoffwechsel von Hefen: I.Wachstum in flüssigen Medien
Biophysik 8, 42-52
- Laskowski W. (1960) Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades:
I.Aufbau homozygoter Stämme und Dosis-effektkurven für ionisierende Strahlen, UV und organische Peroxyde
Z.Naturforsch. 15 b, 495-506
- Laskowski W., Stein W. (1960a) II.Mikroskopische Beobachtung nach Inaktivierung mit ionisierenden Strahlen, UV und org.Peroxyden
Z.Naturforsch. 15 b, 604-612
- Laskowski W., Lochmann E.R.,
Wacker A., Stein W. (1960b) III.Biochemische Eigenschaften in Abhängigkeit vom Ploidiegrad und Kombination der Paarungsallele
Z.Naturforsch. 15 b, 730-734
- Laskowski W., Lochmann E.R.,
Jannsen S., Fink E. (1968) Zur Isolierung einer strahlensensiblen Saccharomyces Mutante. Empfindlichkeit des Koloniebildungsvermögens, der RNS- und Proteinsynthese
Biophysik 4, 233-242
- Lochmann E.-R., Umlauf C.(1971) Über den Einfluß der Zellkonzentration auf die Dunkelreaktivierung von Saccharomyces-Zellen nach UV-Bestrahlung
stud.biophys. 27, 85-90
- de Lucia P., Cairns J. (1969) Isolation of an E.coli strain with a mutation affecting DNA polymerase
Nature 224, 1164-1169

- Matsudeira H., Furuno J.,
Otsuka H. (1970) Possible requirement of ATP for the
rejoining of X-ray induced breaks in
the DNA of Ehrlich ascites tumor cells
Int.J.Radiat.Biol. 17, 339-347
- Mc Grath R.A., Williams R.W.
(1966) Reconstruction in vivo of irradiated
Escherichia RNA, the rejoining of broken
pieces
Nature 212, 534-535
- Mc Grath R.A., Williams R.W.
(1967) Interruptions in single strands of the
DNA in Slime mold and other organisms
Biophys.J. 7, 309-317
- Mosin A.F. (1969) Synthesis of ATP and recovery from
damage by UV or γ -irradiation in yeast
Nature 221, 1968-1970
- Mosin A.F. (1969a) On the antagonistic action of jodace-
tate and aethanol on the recovery of
yeast
stud.biophys. 13, 21-26
- Mühlig P. (1969) Kinetische in vivo-Kriterien zur Auf-
stellung eines Modelles der Oxidativen
Phosphorylierung
stud.biophys. 14, 267-276
- Nakayama H., Okubo S., Takagi Y.
(1971) Repair of UV-damaged DNA in Micrococcus
lysodeikticus
I. An endonuclease specific for UV-
irradiated DNA
BiochemBiophys.Acta 228, 228
- Niel van C.B., Anderson E.H.
(1941) On the occurrence of fermentative assi-
milatation
J.cell.comp.Physiol. 17, 49-56
- Okazaki R., Okazaki T., Sakabe K.
(1966) An extracellular nuclease of Bacillus
subtilis: Some novel properties as a
DNA exonuclease
Biochem.Biophys.Res.Comm. 22, 611-619
- Okazaki R., Okazaki T.,
Sakabe K., Sugitumo K. (1967) Mechanism of DNA replication possible
discontinuity of DNA chain growth
Jap.J.Med.Sci.Biol. 20, 255-260
- Okazaki R., Okazaki T., Sakabe K.
Sugitumo K., Sugino A. (1968) Mechanism of DNA chain growth: I. Possible
discontinuity and unusual secondary
structure of newly synthesized chains
Proc.Nat.Acad.Sci. 59, 598-605

- Okazaki T., Okazaki R. (1969) Mechanism of DNA chain growth: IV. Direction of synthesis of T4 short DNA chains as revealed by exonucleotic degradation
Proc.Nat.Acad.Sci. 64, 1242-1248
- Papirmeister B., Davison C.(1964) Elimination of sulphur mustard induced products from DNA of E.coli
Biochem.Biophys.Res.Comm. 17, 608-617
- Patrick M.H., Haynes R.H., Uretz R.B. (1964) Dark recovery phenomena in yeast I. Comparative effects with various inactivating agents
Radiat.Res. 21, 144-163
- Patrick M.H., Haynes R.H. (1964a) Dark recovery phenomena II. Conditions that modify the recovery process
Radiat.Res. 23, 564-579
- Patrick M.H., Rupert C.S (1967) The effects of host-cell reactivation on assay of UV-irradiated Haemophilus influenzae transforming DNA
Photochem.Photobiol. 6, 1-20
- Pye E.K. (1969) Biochemical mechanisms underlying the metabolic oscillations in yeast
Canad.J.Bot. 47, 271-285
- Pohlit W., Laskowski W., Lochmann E.-R. (1966) Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades: VIII. Untersuchungen zum Kohlenstoffwechsel unbestrahlter Zellen
Z.Naturforsch. 21 b, 1089-1096
- Reichert U. (1968) Gendosiswirkungen in einem tri- und tetraploiden ad_2 -Mutantensystem von Saccharomyces und deren molekularbiologische Deutung
Dissertation der Math.-Nat.Fak. der Freien Universität Berlin 1968
- Resnick M.A., Holliday R. (1971) Genetic repair and the synthesis of nitrate reductase in Ustilago maydis after UV irradiation
Molec.Gen.Genetics 111, 171-184
- Rupert C.S., Goodgal S.H., Herriott R.M. (1958) Photoreactivation in vitro of UV inactivated Haemophilus influenzae transforming factor
J.Gen.Physiol. 41, 451-471
- Rupert C.S. (1960) Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from bakers yeast
J.Gen.Physiol. 43, 573-595

- Rupert C.S., Harm W. (1966) Reactivation of photobiological damage, in: *Advances in Radiation Biology*, Vol II p.1-81, Acad.Press, New York
- Rupp W.D., Howard-Flanders P. (1968) Discontinuities in the DNA synthesized in an excisiondeficient strain of *E.coli* following UV-irradiation
J.Molec.Biol. 31, 291-304
- Sakabe K., Okazaki R. (1966) A unique property of the replicating region of chromosomal DNA
Biochim.Biophys.Acta 129, 651-654
- Sarachek A., Goering R., Bish J.T. (1969) Different effects of growth temperature on inactivation and mutation of *Candida albicans* by UV-radiation
Arch.Mikrobiol. 67, 189-198
- Schaarschmidt B. (1970) Eine einfache Methode zur Bestimmung des Quantenflusses von Bestrahlungsampfen im Wellenlängenbereich 2400-6000 Å
Z.Naturforsch. 25 b, 330-331
- Schuster H. (1969) Die molekularen Grundlagen der Photoreaktivierung
Curr.Topics Microbiol. 47, 40-68
- Sedliaková M., Mašek F., Bernátová L. (1971) Relationship between survival and thymine dimer excision in UV-irradiated *E.coli*
Photochem.Photobiol. 14, 597-605
- Setlow J.K. (1967) Contribution of dimers containing cytosine to UV-inactivation of transforming DNA
Nature 213, 907-909
- Setlow R.B., Carrier W.L.(1964) The disappearance of thymine dimers from DNA: An error-correcting mechanism
Proc.Nat.Acad.Sci. 51, 226-231
- Setlow R.B. (1967) Repair of DNA, in: *Regulation of nucleic acid and protein biosynthesis*. Elsevier, Amsterdam 1967
- Smith-Sonneborn J. (1971) Age correlated sensitivity to UV radiation in *Paramecium*
Rad.Res. 46, 64-69
- Stein W., Meutzner J. (1950) Reaktivierung von UV-inaktiven *Bacterium coli* durch Wärme
Naturwiss. 37, 167-168

- Unrau P. (1969) The isolation of pyrimidine dimers in UV-sensitive strains of yeast
Lunteren Lectures on Molecular Biology Abstr.Sect. III,3
- Wacker A. (1963) Molecular mechanisms of radiation effects, in: Progress in nucleic acid research, Vol.I, New York, Academic Press
- Watson J.D. (1968) The double Helix, Athenaeum, New York 1968
- Weiss B., Richardson C.C. (1967) Enzymatic breakage and rejoining of DNA: I.Repair of single stranded breaks in DNA by an enzyme system from E.coli infected with T4 bacteriophage
Proc.Nat.Acad.Sci. 57, 1021-1028
- Werbin H., Rupert C.S. (1968) Presence of photoreactivating enzyme in blue-green alga cells
Photochem.Photobiol. 7, 225-230
- Westergaard O. (1970) Separation of two DNA polymerase fractions from Tetrahymena cells after excision-repairable damage to DNA
Biochim.Biophys.Acta 213, 36-44
- Whitehouse H., Hastings P.(1965) The analysis of genetic recombination on the polaron hybrid DNA model
Gent.Res.(Camb) 6, 27-92
- Wilkins R.J. (1970) Influence of glucose on the repair of single strand breaks in DNA of X-irradiated E.coli B/r
Int.J.Radiat.Biol. 17, 239-296
- Witkin E.M. (1969) Ultraviolet-induced mutation and DNA repair
Ann.Rev.Microbiol. 23, 487-514
- Zimmermann F.K. (1968) The effect of liquid holding on chemical induced lethality and mitotic gene conversion in Saccharomyces cerevisiae
Molec.Gen.Genetics 103, 11-20

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden in der Zeit von Februar 1970 bis Februar 1972 in der Arbeitsgruppe Biophysik des Zentralinstitutes für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Stein durchgeführt, dem ich für Unterstützung und anregende Diskussionen sehr zu Dank verbunden bin.

Herrn Dr. D. Averbek danke ich für die Überlassung der Hefestämme, Fräulein F. Eckardt für Beratung in biologischen Fragen, Frau C. Umlauf für technische Assistenz bei den Inaktivierungsversuchen und Herrn G. Bjeske für die sorgfältige Anfertigung verschiedener Kalorimeterzusätze.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt Herrn Dr. I. Lamprecht, der durch stets hilfsbereite Unterstützung, zahlreiche Gespräche und Anregungen den Fortgang der Arbeit wesentlich gefördert hat.

Nicht zuletzt hat meine Frau, Heidrun Schaarschmidt, durch einsichtige Geduld sowie durch Mithilfe bei der Fertigstellung des Manuskriptes und der Abbildungen zum Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen.

LEBENS LAUF

Am 3.12.1941 wurde ich als fünftes Kind des Bürgermeisters Fritz Schaarschmidt und seiner Ehefrau Martha, geb. Herzog, in Bad-Elster/Sachsen geboren.

Im Sommer 1949 siedelten wir nach Baden Kr. Verden um. Dort besuchte ich vier Jahre lang die Grundschule, anschließend die Mittelschule in Achim und ab 1955 das Gymnasium an der Hermann-Böse-Straße in Bremen, an dem ich im Februar 1962 das Abitur ablegte.

Nach einer zweijährigen Dienstzeit bei der Bundeswehr wurde ich zum Sommersemester 1964 an der Freien Universität Berlin im Fach Physik immatrikuliert. Ich legte im Sommersemester 1966 die Diplom-Vorprüfung ab, wechselte für ein Semester an die Universität Mainz und studierte ab 1967 wieder in Berlin. Im November 1969 bestand ich die Diplom-Hauptprüfung in Physik. Die experimentellen Arbeiten dazu wurden unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Stein im Institut für Biophysik durchgeführt.

Am 29.5.1969 schloß ich die Ehe mit Heidrun Netzel.

Vom 1.4.1969 bis 31.12.1969 war ich wissenschaftlicher Hilfsassistent am Institut für Biophysik, seit dem 1.1.1970 Wissenschaftlicher Assistent.

Druck:

Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -

1 Berlin 41, Kelchstraße 31

